



INFLUÊNCIA DO CÁDMIO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE CRESCIMENTO DE NABIÇAS (*Brassica rapa*)

Patrícia Souza Barbosa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins

Co-orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Júri:

PRESIDENTE - Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

VOGAIS - Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor David Paulo Fangueiro, Investigador Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

Quero utilizar este espaço para agradecer a todos aqueles que directa ou indirectamente me ajudaram na realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, quero expressar o mais sincero agradecimento aos meus orientadores, Doutora Luísa Louro e Doutor Miguel Mourato, não só por terem aceite a orientação deste trabalho, mas também, pela força, empenho e dedicação demonstrada ao longo destes últimos meses.

Ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, especificamente à UIQA (unidade de investigação de química ambiental) pela facilitação de meios e condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Empresa Póvoa Semente pelo fornecimento das sementes de nabiça (*Brassica rapa* var. *rapa*).

À Mestre Rafaela Reis, pela paciência, amizade e imensa sabedoria que me transmitiu.

À Filipa e Inês, minhas companheiras de laboratório, com as quais aprendi muito, mas principalmente pelos bons momentos que passamos juntas.

Ao Sr. Felício, pela colaboração e ajuda durante o ensaio no Horto.

À Agrolivro (Susana Pina) pela disponibilização de diversas publicações que foram úteis na realização deste trabalho e principalmente pelos bons momentos proporcionados na cafetaria da livraria.

Aos meus pais e manos (Fabrício e Fabiana) por me terem ajudado em todas as fases deste curso, pelo amor, amizade, paciência e confiança que sempre depositaram em mim.

Aos meus amados sobrinhos (Samuel e Daniel) pelo amor e momentos divertidos que em muito me ajudaram a ultrapassar essa fase tão importante da minha vida.

Ao Junio pelo apoio e compreensão.

Ao Fabrício, Suely, Ana Clara e David, pelo apoio e fortes laços de amizade e carinho.

À Maria Aparecida e tia Sandra, amigas de todos os momentos.

E acima de tudo agradeço a Deus por me ter permitido concluir este mestrado.

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a resposta de plantas de nabiças (*Brassica rapa*) ao stresse oxidativo induzido por cádmio em duas condições distintas, hidroponia (10 e 25 μM) e em turfas (10 μM).

Nas plantas foram verificados aspectos fisiológicos como o comprimento, nº de folhas, biomassa e peso seco das folhas e raízes. Foram determinadas as concentrações de Cd, Na, K, Ca, Mg, Zn, Mn e Fe, sendo também determinados indicadores de stress oxidativo (MDA e H_2O_2) e o teor de clorofila (método espectrofotométrico e leitura do aparelho Hansatech).

As concentrações de Cd nas folhas foram maiores no ensaio em hidroponia do que em turfas porque em solução nutritiva o Cd se encontrava mais disponível.

Os principais elementos minerais afectados pelo cádmio foram o Zn, Fe e Na, que na presença de 25 μM de Cd apresentaram concentrações menores.

Em plantas expostas a 10 μM de Cd, observou-se que o cádmio induziu o aumento de H_2O_2 nas folhas (em hidroponia). As folhas sofreram maior peroxidação lipídica do que as raízes.

Em conclusão, as nabiças mesmo quando expostas a concentrações de 25 μM de Cd, não apresentam alterações visuais notórias, o que pode representar um perigo para a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Cádmio, nabiça, *Brassica rapa*, stress oxidativo.

ABSTRACT

In this work the response of *Brassica rapa* to cadmium induced oxidative stress was studied, both in hydroponic solution (with Cd concentrations of 10 and 25 μM) and in turf (10 μM).

The following parameters were studied: plant length, number of leaves, fresh and dry weight of leaves and roots, mineral elements concentration (Cd, Na, K, Ca, Mg, Zn, Mn and Fe), MDA and H_2O_2 levels and chlorophyll content.

The Cd contents in leaves were significantly higher in plants growing in hydroponic solution than in turfs, because Cd is more available in nutrient solution.

The minerals mainly affected by Cd were Zn, Fe and Na, whose content in leaves decreased significantly when plants were grown in 25 μM Cd.

In plants growing in 10 μM Cd, in hydroponic solution, an increase in H_2O_2 levels was detected. A higher level of lipid peroxidation was also detected in plants growing in Cd containing solution.

It can be concluded that *B. rapa* plants, even when exposed to a concentration of 25 μM Cd, are not visually affected by Cd toxicity, although its leaves contain significant amounts of Cd, which can represent a danger for the consumer as the plants continue to look healthy.

Key-words: Cadmium, turnip, *Brassica rapa*, oxidative stress.

EXTENDED ABSTRACT

Plants can be subjected to several stresses, both biotic (caused by other living organisms) and abiotic (caused by non-living environmental factors like the presence of heavy metals).

The presence of heavy metals induces an increase in intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) which causes oxidative stress in plants.

The main consequence of this oxidative stress in cells is membrane lipid peroxidation, protein oxidation, enzymatic inhibition and damage to both DNA and RNA, causing leaf senescence and necrosis and changes to the photosynthetic apparatus. A byproduct of lipid peroxidation, that is frequently used to measure this effect, is malondialdehyde (MDA).

Due to the fact that toxic heavy metals like Cd can be readily absorbed by plants, it is important to study their effect, as they can easily enter the food chain affecting Man and other animals.

Plants of the *Brassica* genus are usually very tolerant to contaminated lands, and can thus accumulate heavy metals while continuing to grow, increasing the probability of its consumption by humans and other animals.

In this work the response of *Brassica rapa* to cadmium induced oxidative stress was studied, both in hydroponic solution (with Cd concentrations of 10 and 25 μM) and in turf (10 μM).

The following parameters were studied: plant length, number of leaves, fresh and dry weight of leaves and roots, mineral elements concentration (Cd, Na, K, Ca, Mg, Zn, Mn and Fe), MDA and H_2O_2 levels and chlorophyll content (using both a spectrophotometric method and the Hansatech readings).

The Cd contents in leaves were significantly higher in plants growing in hydroponic solution than in turfs, because Cd is more available in nutrient solution, while the turf can absorb part of the Cd.

The minerals mainly affected by Cd were Zn, Fe and Na, whose content in leaves decreased significantly when plants were grown in 25 μM Cd. This shows that probably there is a competition between Cd and these elements for their uptake at the root level or that the translocation to the leaves is being affected.

In plants growing in 10 μM Cd, in hydroponic solution, an increase in H_2O_2 levels was detected. A higher level of lipid peroxidation was also detected in plants growing in Cd containing solution.

Chlorophyll content decreased in plants growing in Cd containing solution, showing that this metal affected the photosynthetic apparatus.

The ratio chlorophyll/carotenoids also decreased and this can be the consequence of a response mechanism against Cd toxicity as it has been reported that carotenoid content can increase to protect the plant from the ROS deleterious effect.

The total content of Cd in plants detected in these experiments are much higher than the maximum allowed by portuguese law, and this could be a cause of concern in terms of food safety because the plants continue to grow and look reasonable healthy without a visual symptom of the Cd content, and thus the consumer is not aware of the possible contamination.

Key-words: Cadmium, turnip, *Brassica rapa*, oxidative stress.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.	iv
EXTENDED ABSTRACT.	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE QUADROS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1.PREÂMBULO	1
2. INTRODUÇÃO	2
2.1. Brássicas	2
2.2. A nabiça	2
2.3. Plantas e stress abiótico por cádmio.....	4
2.3.1. Metais pesados	4
2.3.2. O cádmio.....	4
2.3.2.1. Doses de referência no consumo de cádmio e legislação	5
2.3.3. Cádmio nas plantas	5
2.3.3.1. Stress oxidativo e produção de ROS	8
2.3.3.2. Mecanismos de defesa e ROS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Delineamento experimental	12
3.1.1. Local dos ensaios	12
3.1.2. Material Biológico.....	12
3.1.3. Ensaios em hidroponia	12
3.1.3.1. Sementeira	13
3.1.3.2. Transplantação para hidroponia	13
3.1.4. Ensaio da rega em turfas	19
3.2.Determinações Analíticas	21
3.2.1. Determinação do peso seco	21

3.2.2. Determinação dos elementos minerais.....	21
3.2.3. Preparação das amostras para as determinações do nível de peroxidação de lípidos e do peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	22
3.2.3.1. Determinação do nível de peroxidação de lípidos.....	23
3.2.3.2. Determinação do peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂).....	23
3.2.4. Determinação da clorofila e carotenoides	24
3.2.5. Determinação de clorofila (correlação valor Hansatech e teor de clorofila)	25
3.3 Tratamento Estatístico	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Resultados do ensaio em hidroponia.....	27
4.1.1. Análise dos elementos minerais.....	27
4.1.2. Efeitos do cádmio quanto aos aspectos fisiológicos.....	33
4.1.2.1. Biomassa e peso seco.....	33
4.1.2.2. Comprimento da parte aérea.....	35
4.1.2.3. Comprimento das raízes	35
4.1.2.4. Número de folhas	36
4.1.3. Avaliação do efeito do cádmio na peroxidação dos lípidos	37
4.1.4. Efeito do cádmio na produção de peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂).....	39
4.1.5. Efeitos do cádmio na clorofila	41
4.1.5.1. Quantificação da clorofila – Valores Hansatech.....	41
4.1.5.2. Quantificação da clorofila de diferentes folha da mesma planta – Valores Hansatech.....	42
4.1.5.3. Quantificação da clorofila – Método espectrofotométrico.....	44
4.1.5.4. Conversão dos valores Hansatech em teor de clorofila.....	46
4.1.6. Carotenoides	47
4.1.7. Carotenoides/clorofila.....	48
4.2. Resultados do ensaio em turfas	49
4.2.1. Análise dos elementos minerais.....	49
4.2.2. Efeitos do cádmio na clorofila.....	54
4.2.2.1. Quantificação da clorofila do ensaio em turfas – Valores Hansatech.....	54

4.2.2.2. Clorofila calculada – Valores Hansatech convertidos em teor de clorofila.....	55
4.2.3. Efeitos do cádmio quanto aos aspectos fisiológicos – Ensaio em turfas.....	56
4.2.3.1. Biomassa das folhas e raízes – Ensaio em turfas.....	56
4.2.3.2. Peso seco das folhas e raízes – Ensaio em turfas.....	58
4.2.3.3. Número de folhas – Ensaio em turfas	59
4.3. Comparação entre os ensaio em hidroponia e o ensaio em turfas.	59
5. CONCLUSÕES.....	63
6. BIBLIOGRAFIA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo da glutathiona-ascorbato.	11
Figura 2 – Imagens do início da germinação das sementes.	13
Figura 3 – Fases da transplantação para hidroponia.	15
Figura 4 – Imagens das plantas na câmara climatizada.	16
Figura 5 – Amostras de plantas recolhidas para as determinações analíticas.	18
Figura 6 – Fases de desenvolvimento das plantas em turfas.	20
Figura 7 – Imagens do microondas (CEM MDS 2000) utilizado para a digestão.	22
Figura 8 – Espectrofotómetro (Hitachi U – 2000 UV/vis Spectrophotometer).	24
Figura 9 – Teor de cádmio nas folhas – Ensaio em hidroponia	27
Figura 10 – Teor de sódio nas folhas – Ensaio em hidroponia.	28
Figura 11 - Teor de potássio nas folhas – Ensaio em hidroponia.	28
Figura 12 - Teor de cálcio nas folhas – Ensaio em hidroponia	29
Figura 13 -Teor de magnésio nas folhas – Ensaio em hidroponia.	30
Figura 14 – Teor de zinco nas folhas – Ensaio em hidroponia	30
Figura 15 – Teor de manganês nas folhas – Ensaio em hidroponia.	31
Figura 16 - Teor de ferro nas folhas – Ensaio em hidroponia.	32
Figura 17 – Biomassa das folhas – Ensaio em hidroponia.	33
Figura 18 – Teor de matéria seca das folhas em percentagem – Ensaio em hidroponia.	34
Figura 19 – Comprimento da parte aérea das plantas – Ensaio em hidroponia.	35
Figura 20 – Comprimento das raízes das plantas – Ensaio em hidroponia.	36
Figura 21 – Número de folhas por plantas – Ensaio em hidroponia.	36
Figura 22 – Concentração média de malondialdeído (MDA) formado em folhas (a) e raízes (b), após exposição ao cádmio em hidroponia.	38
Figura 23 – Teor médio de peróxido de hidrogénio formado nas folhas (a) e raízes (b), após exposição das nabiças ao cádmio em hidroponia.	40
Figura 24 – Teor médio de clorofila expresso em unidades arbitrárias – Ensaio em hidroponia.	41
Figura 25 – Teor médio de clorofila expresso em unidades arbitrárias, para três folhas de uma planta escolhida aleatoriamente – Ensaio em hidroponia.	43

Figura 26 – Teor da clorofila total em folhas de nabiça (determinado pelo método espectrofotométrico de Sims & Ganon, 2002) – Ensaio em hidroponia.	45
Figura 27 – Curva padrão que correlaciona os valores da leitura do hansatech com o teor de clorofila total obtido pelo método espectrofotométrico.	46
Figura 28 – Teor médio de carotenoides – Ensaio em hidroponia.	47
Figura 29 – Razão carotenoides/clorofila total nas folhas das nabiças – Ensaio em hidroponia.	48
Figura 30 – Teor de cádmio nas folhas – Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	49
Figura 31 – Teor de cádmio nas turfas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	50
Figura 32 – Teor de sódio nas folhas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	50
Figura 33 - Teor de potássio nas folhas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	51
Figura 34 - Teor de cálcio nas folhas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	51
Figura 35 - Teor de magnésio nas folhas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	52
Figura 36 - Teor de zinco nas folhas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	52
Figura 37 - Teor de manganês nas folhas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	53
Figura 38 - Teor de ferro nas folhas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	53
Figura 39 – Teor médio de clorofila expresso em unidades arbitrárias - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	54
Figura 40 – Quantificação da clorofila calculada - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	55
Figura 41 – Biomassa das folhas (a) e raízes (b) - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	56
Figura 42 – Peso seco das folhas (a) e raízes (b) em percentagem - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	58
Figura 43 – Número médio de folhas por plantas - Ensaio da rega contaminada (10 μ M de Cd) em turfas.	59

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Composição média das nabijas. Valores expressos por 100g de parte comestível.	3
Quadro 2 – Composição da solução nutritiva de Hoagland.....	14
Quadro 3 – Quantidade de plantas retiradas nos ensaios realizados em solução nutritiva.	17
Quadro 4 – Soluções utilizadas na construção da curva padrão que correlaciona os valores de absorvância com os teores de H_2O_2 das amostras lidas no espectrofotômetro.....	24
Quadro 5 – Comparação entre o ensaio em hidroponia e o ensaio em turfas.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AGC – Glutationa-ascorbato

APX – Ascorbato-peroxidase

CAT – Catalase

DHA - Desidroascorbato

DHAR – Desidroascorbato-redutase

DNA – *Deoxiribonucleic Acid*; Ácido desoxirribonucleico

GPX – Glutationa-peroxidase

GSH – Glutationa

GSSG – Glutationa oxidada

GR – Glutationa redutase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HO• – Radical hidróxilo

MDA – Malondialdeído

MDHA - Monodesidroascorbato

MDHAR – Monodesidroascorbato-redutase

MS – Massa seca

MF – Massa fresca

O₂• – Radical superóxido

¹O₂ – Singleto de oxigénio

PCs - Fitoquelatinas

PF – Peso fresco

PS – Peso seco

ROS – *Reactive oxygen species*; Espécies reactivas de oxigénio

SOD – Superóxido-dismutase

RNA – *Ribonucleic Acid*; Ácido ribonucleico

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

1. PREÂMBULO

As plantas passam constantemente por diversas situações de stresse, que podem ser bióticas (causadas por outros seres vivos) ou abióticas (causadas por um factor externo que não um ser vivo, como por exemplo seca, excesso de água ou de luz, metais pesados, etc.). Normalmente conseguem desenvolver respostas de defesa de forma a tentar superar tais situações e retornar ao metabolismo normal.

Devido à sua toxicidade torna-se cada vez mais importante estudar os efeitos dos metais pesados em plantas, uma vez que metais como o Cádmio (Cd) são captados eficientemente por muitas plantas, podendo assim entrar na cadeia alimentar do homem e outros animais.

O cádmio está presente na grande maioria dos alimentos. Em alimentos obtidos em zonas não poluídas, os níveis de cádmio são geralmente inferiores a 0,1 mg/kg (peso fresco). Em zonas não contaminadas, a média diária de ingestão humana de cádmio é de 10 a 25 µg. Considerando a absorção intestinal de 5%, esta ingestão resulta numa absorção de 0,5 a 1 µg de cádmio por dia a partir de alimentos (ATSDR 1999, <http://www.cadmium.org>).

A fitotoxicidade de um metal pesado depende de vários factores como biodisponibilidade (presença de formas no solo capazes de serem utilizadas pelas plantas), natureza do metal, solubilidade, mobilidade na planta e taxa de acumulação nos seres vivos.

Algumas plantas são consideradas acumuladoras de determinados metais, ou seja, conseguem conter elevadas quantidades intracelulares de metais pesados, que para outros organismos são tóxicos mesmo em quantidades muito inferiores. Estas plantas desenvolvem alterações fisiológicas que combatem os efeitos indesejáveis provocados por esses metais.

Na presença de metais pesados há um aumento intracelular de ROS¹ (*reactive oxygen species* ou espécies reactivas de oxigénio) que induz o stresse oxidativo nas plantas.

As principais consequências do stresse oxidativo são a peroxidação dos lípidos da membrana, oxidação proteica, inibição enzimática e danos ao nível do DNA e RNA, provocando senescência, alterações à fotossíntese e necrose das folhas.

Devido à sua gravidade é importante perceber o efeito da fitotoxicidade do cádmio em plantas. O objectivo deste trabalho foi estudar esse efeito nas nabijas, plantas tolerantes ao cádmio e de grande importância alimentar e económica.

¹ A abreviatura ROS provem do inglês Reactive Oxygen Species, no entanto, devida à sua utilização generalizada, optou-se pela sua utilização neste trabalho.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Brássicas

A família Brassicaceae inclui geralmente plantas herbáceas ou sub-arbustos, que se distribuem por cerca de 419 géneros e mais de quatro mil espécies. Entre as espécies hortícolas de interesse económico, constam-se a nabiça, a couve-china, a couve-flor, os brócolos, a couve-portuguesa, dentre outros. O consumo das brássicas é relativamente elevado, por comparação com outros vegetais e variável dependendo da região geográfica (Almeida, 2006).

As Brassicáceas são espécies que se podem encontrar em vários lugares do mundo, encontrando-se, no entanto, em maior diversidade na região do Mediterrâneo, no continente asiático e na América do Norte. São espécies de grande importância económica e estão entre as principais culturas hortícolas a nível mundial, a avaliar pela área, volume de produção e pelo consumo. A maioria das brássicas são cultivadas para aproveitamento das folhas, embora algumas espécies forneçam raízes comestíveis e outras sejam aproveitadas pelas suas sementes.

Além de vitaminas, minerais, fibras e outros nutrientes, as brássicas possuem alguns metabolitos secundários, designados por glucosinolatos, que para além de determinarem o aroma característico destas plantas podem contribuir para evitar a formação de vários tipos de cancro (Almeida, 2006).

2.2. A Nabiça

A nabiça (*Brassica rapa* var. *rapa*) é uma planta dicotiledónea herbácea, pertencente à família das Brassicaceae do género *Brassica*. Esta planta é normalmente cultivada na Península Ibérica para aproveitamento das raízes tuberosas (nabo), das inflorescências (grelo) e das folhas (nabiças) (Almeida, 2006).

É uma cultura que se adapta bem a climas temperados e um pouco húmidos, sendo indicada como cultura de inverno. Em condições de altas temperaturas e secura a sua produtividade é fortemente reduzida (Gardê & Gardê, 1988). Pode ser cultivada em vários tipos de solos, desde que tenham alguma profundidade e valores de pH entre 5,5 e 7 (Biggs, 1980).

Plantas de nabiça com qualidade desejada para venda / consumo, devem apresentar um comprimento não muito superior a 50 cm, coloração verde média a escura e consistência

tenra a muito tenra. As características requeridas atingem-se no início do ciclo vegetativo, pois com o decorrer do tempo as plantas tornam-se mais duras e a coloração verde atenua-se.

A nabiça é uma planta de crescimento rápido, estando pronta para consumo 6 a 12 semanas após a sementeira (Biggs, 1980). Para suprir as necessidades em nutrientes e água, criadas pela intensa produção de biomassa inerente ao rápido crescimento das plantas, torna-se indispensável o recurso à rega e à fertilização. Alguns estudos têm demonstrado que a nabiça é sensível ao défice de água e que, geralmente, a produção aumenta com a rega (Smitle et al., 1992; Simonne et al., 1993).

Na gastronomia portuguesa é uma hortaliça tradicionalmente usada na confecção de sopas e esparregado. É uma cultura pobre em hidratos de carbono, com baixo valor calórico e possui quantidades apreciáveis de vitaminas A e C, e sais minerais (particularmente em cálcio) conforme apresentado no Quadro1.

Quadro 1. Composição nutritiva média das nabiças. Valores expressos por 100 g de parte comestível (Adaptado de Almeida, 2006).

Macronutrientes	Teor nas Nabiças	Vitaminas	Teor nas Nabiças	Minerais	Teor nas Nabiças
Água (%)	90	Vitamina A (UI)	11587	Potássio (mg)	296
Energia (kcal)	32	Tiamina (mg)	0,07	Cálcio (mg)	190
Proteína (%)	1,5	Riboflavina (mg)	0,1	Fósforo (mg)	42
Gordura (%)	0,3	Niacina (mg)	0,6	Magnésio (mg)	31
Hidratos de carbono (%)	7,13	Ácido ascórbico (mg)	60	Sódio (mg)	40
Fibra (%)	3,2	Vitamina B6 (mg)	0,263	Ferro (mg)	1,1

2.3. Plantas e stress abiótico por cádmio

2.3.1. Metais pesados

De acordo com a definição do dicionário de Ecologia e Ciências Ambientais, metais pesados são os metais com número atômico médio ou alto, como o cobre, o cádmio, a prata, o arsénio, o cromo e o mercúrio. E que são tóxicos em concentrações relativamente baixas. Persistem no ambiente e podem se acumular em níveis que interrompem o crescimento das plantas e interferem na vida animal.

Os metais pesados fazem parte do grupo dos elementos vestigiais, ou seja estão presentes em baixas quantidades nos solos, plantas e águas (Prasad, 2004).

A definição de metal pesado é muito variável. As definições baseiam-se em vários parâmetros como: a densidade dos elementos, a massa atômica, o número atômico e a toxicidade (Duffus, 2002). Alguns autores consideram que os metais pesados são elementos com densidade superior a 5 g/cm³, sendo a densidade do cádmio é igual a 8,6 g/cm³ (Prasad, 2004).

Existem metais pesados essenciais para as plantas como o Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Ni e B e metais pesados não essenciais como o Cd, Hg e Pb que aparecem na natureza como poluentes.

Os metais pesados existentes naturalmente nas rochas, apresentam menores riscos para os seres vivos. A ocorrência natural de metais pesados em solos depende, principalmente, do material de origem do solo e dos seus processos de formação. Contudo, na sua grande maioria os metais pesados aparecem nos solos por contaminação resultante da actividade antropogénica - agrícola, industrial e mineira (Martins & Mourato, 2008).

2.3.2. O Cádmio

O cádmio (Cd) é um dos principais contaminantes ambientais e um dos mais tóxicos entre os metais pesados (Chen & Kao, 1995). Foi descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco. É um metal de transição não essencial, de cor branca-prateada, lustroso, maleável e flexível. Usualmente é encontrado sob a forma de ião metálico bivalente.

O cádmio nos solos pode ter uma origem natural (geogénica) ou resulta da actividade industrial (antropogénica). Em geral é encontrado na crosta terrestre ligado a outros elementos, como oxigénio (na forma de óxido de cádmio), cloro (na forma de cloreto de cádmio) ou enxofre (na forma sulfato e sulfito de cádmio), estes compostos encontram-se na forma sólida e têm diferentes solubilidades em água (ATSDR 1999).

Estima-se que anualmente sejam libertadas cerca de 25 000 a 30 000 toneladas de cádmio para o meio ambiente. Cerca de metade resulta de processos graduais como a erosão e abrasão de rochas. Fenómenos isolados como as erupções vulcânicas ou fogos florestais resultam também na libertação de cádmio para o ambiente (<http://www.cadmium.org>).

A libertação de cádmio resultante de actividades humanas é cerca de 4 000 a 13 000 toneladas por ano, sendo as maiores contribuições das indústrias de combustíveis fósseis e das actividades mineiras. Outras actividades responsáveis pela libertação de cádmio para o ambiente são a incineração de resíduos domésticos e municipais, esgotos, fundição de metais, utilização de fertilizantes fosfatados, a eliminação de produtos contendo cádmio, efluentes industriais contaminados, fabricação de baterias de automóveis, formulação de pigmentos, tráfego urbano, estabilização de plástico e fertilizantes fosfatados (Cuypers et al, 2010).

As contaminações de cádmio nos solos são particularmente importantes porque este metal é captado eficientemente pelas plantas, entrando assim na cadeia alimentar do Homem e outros animais (ATSDR 1999).

2.3.2.1. Doses de referência no consumo de cádmio e Legislação

Segundo a Agência de Protecção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América, a dose oral de referência de cádmio é de 0,5 µg/Kg para a água e de 1 µg/Kg para os alimentos.

E a ingestão média diária de cádmio é de 75 µg pelos alimentos e de 20 µg pela água ingerida (para um teor médio na água de 0,01 mg/L), o que resulta numa exposição oral diária de 95 µg. A EPA assume que 2,5% da absorção de cádmio advém dos alimentos e 5% da água (ASAE 2008).

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001, o teor máximo de cádmio nos produtos hortícolas de folha é de 0,2 mg / kg de peso fresco.

2.3.3. Cádmio nas plantas

As plantas constituem-se o principal ponto de entrada do cádmio na cadeia alimentar. Contrariamente a outros metais pesados tóxicos, o cádmio presente no solo é facilmente absorvido pelas raízes das plantas, particularmente em solos ácidos (Guimarães et al 2008).

O crescimento do sistema radicular das plantas é um dos parâmetros mais sensíveis aos efeitos do cádmio, como tem sido reportado em diversas espécies de plantas, tais como

couve-chinesa (*Brassica pekinensis*) e couve-da-Malásia (*Brassica chinensis*). De acordo com Liu et al., (2007), concentrações de cádmio superiores a 10 μM (em solução nutritiva) reduzem significativamente o alongamento das raízes e o conteúdo de clorofila das folhas de ambas as espécies de brássicas.

Após absorvido pelo sistema radicular das plantas o cádmio é translocado, via xilema, para a parte aérea. Nas plantas a presença de Cd pode diminuir o crescimento, reduzir a taxa de fotossíntese e provocar alterações metabólicas tanto ao nível enzimático como não enzimático. O estágio de desenvolvimento da planta e o tempo de exposição ao metal pesado afectam a absorção e distribuição de Cd em diferentes partes do vegetal (Melo et al. 1997; Gonçalves et al. 2009).

Existem plantas capazes de captar o cádmio dos solos e de o acumular, atingindo concentrações muito elevadas (superiores às que causam toxicidade em humanos e outros animais). A acumulação de metais em tecidos vegetais depende de factores como natureza do vegetal (capacidade de tolerância e acumulação de metais), pH do solo (em solos ácidos o cádmio está mais disponível para ser captado pelas plantas), quantidade de matéria orgânica e a quantidade do metal no solo, variações de temperatura, luminosidade, humidade, aplicações de agentes correctivos e fertilizantes (ASAE 2008).

Na maioria das plantas o cádmio acumula-se mais nas raízes do que nas folhas. A baixa acumulação de Cd nas folhas pode ser uma estratégia para proteger a função fotossintética do stress oxidativo induzido pelo cádmio (Milner & Kochian, 2008; Markovska et al. 2009)

Nas plantas o cádmio afecta a absorção, transporte e uso de elementos como o cálcio, fósforo, potássio e enxofre, bem como da água. Podendo também provocar deficiência de ferro. Nas mitocôndrias, o excesso de cádmio pode promover alterações na permeabilidade de suas membranas ao potássio, hidrogénio e cloro. O Cd também reduz a absorção de nitrato e seu transporte das raízes para a parte aérea através da inibição da enzima nitrato redutase das folhas. Sua presença pode também afectar o metabolismo de alguns micronutrientes, como o ferro, o manganês e o magnésio (Soares & Machado, 2007).

A presença de Cd causa efeitos variados na actividade enzimática. O alvo potencial da acção de metais como o Cd, são enzimas e proteínas que contêm grupos sulfidril (SH) ligados entre si por ligações dissulfeto. A presença do Cd leva à oxidação destes grupos que reagindo com o enxofre, destrói as ligações dissulfeto, desnaturando a proteína, e assim resultando na redução da actividade enzimática (Guimarães et al 2008). A redução nos níveis da actividade de enzimas antioxidantes poderia por si só explicar a ocorrência de stress oxidativo provocado pelo Cd, entretanto o stress pode ser acentuado por

interferências no sistema de defesa antioxidante não enzimático. Plantas expostas ao cádmio podem apresentar declínio nos níveis de glutathione, devido a um aumento na produção de fitoquelatinas. Essa redução na disponibilidade de glutathione pode favorecer o stress oxidativo (Hirata et al., 2005; Devi & Prasad, 2004).

As fitoquelatinas (PCs) são péptidos que actuam como agentes quelantes, formando complexos com os metais pesados nas plantas. Para a síntese de PCs é necessário ocorrer a síntese de cisteína suficiente para a formação de glutathione (GSH). Quando o metal pesado entra em contacto com a enzima fitoquelatina sintase, torna-se activa e catalisa a conversão de glutathione em fitoquelatina (Pernia et al., 2008). De acordo com Hirata et al., (2005), o cádmio é o activador mais eficaz dessa enzima comparado a outros metais pesados.

Estudos indicam as fitoquelatinas como responsáveis pela desintoxicação de certos metais pesados e pela manutenção da homeostase dos níveis intracelulares de iões metálicos essenciais (Hirata et al., 2005; Cobbett, C., 2000).

A maior concentração do cádmio nas raízes das plantas pode ser uma das primeiras barreiras de defesa da planta contra a toxicidade a este metal pesado. Os hidratos de carbono excretados pelas raízes têm poder quelante sobre o Cd. Entretanto, a significância deste mecanismo na desintoxicação é variável e ainda precisa ser melhor caracterizado (Guimarães et al., 2008).

Estudos em batata (*Solanum tuberosum* L.) e cebolinho (*Allium Schoenoprasum* L.) submetidos a diferentes doses de cádmio apresentaram efeito positivo no crescimento vegetal quando expostos a baixas doses deste metal. Essa resposta positiva do organismo ao crescimento a baixas doses de muitas substâncias tóxicas geralmente está associada ao efeito hormético. A hormese representa uma resposta de super compensação do crescimento em razão de um desequilíbrio na homeostase dos tecidos (Barazani et al., 2004; Calabrese & Blain, 2005; Gonçalves et al., 2009).

As plantas do género *Brassica* são normalmente plantas tolerantes a meios contaminados com metais tóxicos como o cádmio, e algumas delas são referidas como sendo acumuladoras podendo ser veículo de contaminação da cadeia alimentar (Markovska et al. 2009).

2.3.3.1. Stresse oxidativo e produção de ROS

O aumento de oxigénio molecular (O_2) na atmosfera da Terra permitiu a evolução de organismos aeróbicos que utilizam o O_2 como aceptor final de electrões. O O_2 é pouco reactivo, mas tem a capacidade de assumir estados excitados reactivos como radicais livres e derivados (Scandalios, 1993). Com dois átomos de oxigénio, o O_2 é completamente reduzido por quatro electrões transportados ao longo da cadeia respiratória, gerando duas moléculas de água. No entanto, uma pequena parcela dos electrões escapa da cadeia respiratória, resultando numa redução parcial do oxigénio molecular, levando à produção de ROS (reactive oxygen species ou espécies reactivas de oxigénio) na forma de singlete de oxigénio (1O_2), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\bullet) e radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Mittler, 2002).

Em situações normais, a produção de ROS nas plantas é relativamente baixa, mas na presença de metais pesados, verifica-se um aumento intracelular de ROS que induz stress oxidativo (Mittler, 2002; Moller et al., 2007).

A produção de ROS durante o stress ocorre principalmente nos organelos com alta actividade de oxidação metabólica ou com o fluxo de electrões sustentado: cloroplastos e mitocôndrias. Nos cloroplastos, a formação de ROS está relacionada com a fotossíntese. O fenómeno de fotorrespiração nos peroxissomos é outra forma de produção de H_2O_2 (Soares & Machado, 2007). Quando as plantas são expostas à luz, a quantidade de peróxido de hidrogénio produzida na mitocôndria é menor que a dos cloroplastos ou peroxissomos, mas, no escuro ou em tecidos não verdes, a mitocôndria pode ser a maior fonte de ROS (Slesak et al., 2007).

Sob condições adequadas de desenvolvimento, a produção de ROS na célula é baixa ($240 \mu M s^{-1} O_2^{\bullet-}$ e um nível de $0,5 \mu M s^{-1} H_2O_2$ nos cloroplastos), enquanto muitos stresses que alteram a homeostase celular acentuam a sua produção (240 a $720 \mu M s^{-1} O_2^{\bullet-}$ e 5 a $15 \mu M H_2O_2$). O nível de ROS é utilizado para monitorar o nível intracelular de stress nas plantas, sendo necessário um controlo rígido para evitar morte celular resultante da hiper acumulação de ROS (Mittler, 2002).

O stresse oxidativo estimula a biossíntese de componentes antioxidantes e aumenta a actividade de enzimas antioxidantes. As ROS podem agir causando danos oxidativos ou como moléculas sinalizadoras que activam múltiplas respostas de defesa (como a resposta ao stress abiótico e a defesa de patógenos). Sendo assim, os níveis celulares de ROS

necessitam serem bem controlados. As principais consequências celulares do stresse oxidativo são a peroxidação dos lípidos da membrana, que é expressa pelo aumento do teor de malondialdeído (MDA), a oxidação proteica, a inibição enzimática e danos ao nível do DNA e RNA. Assim, as ROS provocam senescência, alterações à fotossíntese e necrose das folhas (Soares & Machado, 2007; Scandalios, 2002; Gallego et al., 1996; Mittler, 2002).

A peroxidação dos lípidos envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, a perda de O₂ e a destruição das membranas, gerando uma variedade de produtos, incluindo cetonas, álcoois, éteres e aldeídos. Um desses produtos é o malondialdeído (MDA) gerado na degradação de ácidos gordos polinsaturados, que é usado para determinar o grau de peroxidação.

Estudos com a mostarda da Índia (*Brassica juncea*) exposta a concentrações elevadas de Cd apresentaram alterações nas folhas de plantas tratadas com concentrações de 30 e 50 µM de Cd. As folhas tratadas com Cd sofreram um aumento do conteúdo de MDA nas folhas e um aumento de H₂O₂, quando comparadas com o controlo (plantas sem cádmio) (Markovska et al. 2009).

A ineficiência da fotossíntese causada pelo cádmio pode se dever à inibição da cadeia de transporte de electrões do cloroplasto, à inibição de enzimas do Ciclo de Calvin ou simplesmente devido à redução da concentração de clorofila (Kurdziel et al., 2004).

Altos níveis de Cd estão associados à má formação do cloroplasto devido ao empilhamento anormal dos grana, redução do número e do tamanho do granum, e à dilatação da membrana do tilacóide. O Cd também altera a quantidade do fosfatidilglicerol, que é reconhecidamente um componente responsável pela oligomerização do complexo clorofila-proteína (Devi & Prasad, 2004).

Sob condições de stress oxidativo, as plantas aumentam suas concentrações de carotenóides, como medida para combater a formação de radicais livres. A relação clorofila / carotenóides diminui, o que pode ser considerado como um biomarcador de stress gerado por metais pesados. A diminuição da concentração de clorofila é atribuída ao facto de que o Cd inibe a sua biossíntese por inibição de enzimas envolvidas nesse processo (Pernia et al., 2008).

2.3.3.2. Mecanismos de defesa e ROS

Em consequência do aumento dos ROS surgem alterações metabólicas que se destinam a evitar os efeitos oxidativos destas espécies. Estas alterações envolvem mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Mittler, 2002). Os mecanismos não enzimáticos envolvem, por um lado a síntese de proteínas com função protectora e de reparação e por outro lado o aumento da produção de compostos antioxidantes não-enzimáticos (glutathiona, ascorbato, tocoferóis, carotenóides e flavonóides), capazes de degradar as ROS sem formação de novas espécies reactivas, que actuam como espécies redutoras (Lagriffould et al., 1998).

Antioxidantes como o ácido ascórbico e a glutathiona, que são encontrados em concentrações elevadas nos cloroplastos e em outros compartimentos celulares (5 – 20 μM ácido ascórbico e 1 – 5 μM glutathiona) e são cruciais para a defesa ao stress oxidativo na planta (Mittler, 2002).

O ascorbato é considerado um dos principais desintoxicantes de ROS nas plantas, devido à sua capacidade de doar electrões em reacções enzimáticas e não enzimáticas. O ascorbato pode eliminar directamente o superóxido, os radicais hidroxilo e o singlete de oxigénio e, assim, reduzir o peróxido de hidrogénio a água via reacção de ascorbato peroxidase (APX) (Blokhina et al, 2003).

Os mecanismos enzimáticos envolvem enzimas que participam directamente na remoção das ROS ou que catalisam reacções de formação e regeneração de moléculas para a sequestração das ROS. Enzimas antioxidantes como superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases como a guaiacol-peroxidase (GPOD), a glutathiona-peroxidase (GPX) e a ascorbato-peroxidase (APX), catalisam a redução enzimática do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 usando agentes redutores específicos e estando envolvidas directamente na remoção destas espécies de ROS (Martins & Mourato, 2008; Mittler, 2002; Scandalios, 1993; Smeets et al, 2007).

A enzima ascorbato-peroxidase utiliza duas moléculas de ascorbato para reduzir H_2O_2 a água, com a geração simultânea de duas moléculas de monodesidroascorbato (MDHA). O MDHA é um radical com vida curta e se não for rapidamente reduzido, converte-se em ascorbato e desidroascorbato (DHA). A DHA é reduzida a ascorbato pela acção da desidroascorbato-redutase (DHAR), usando a glutathiona (GSH) como substrato para redução. Esta redução gera glutathiona dissulfeto (GSSG), que por sua vez é re-reduzida para GSH utilizando NADPH, uma reacção catalisada pela glutathiona redutase (GR).

A remoção de H_2O_2 através desta série de reacções é conhecida como ciclo glutatona-ascorbato (Figura 1). O ascorbato e a glutatona não são consumidos pela via glutatona-ascorbato, mas participam de uma transferência cíclica que reduz equivalentes, envolvendo quatro enzimas (APX, monodesidroascorbato-redutase (MDHAR), DHAR e GR), o que permite a redução do H_2O_2 em água usando electrões provenientes do NADPH (Noctor & Foyer, 1998).

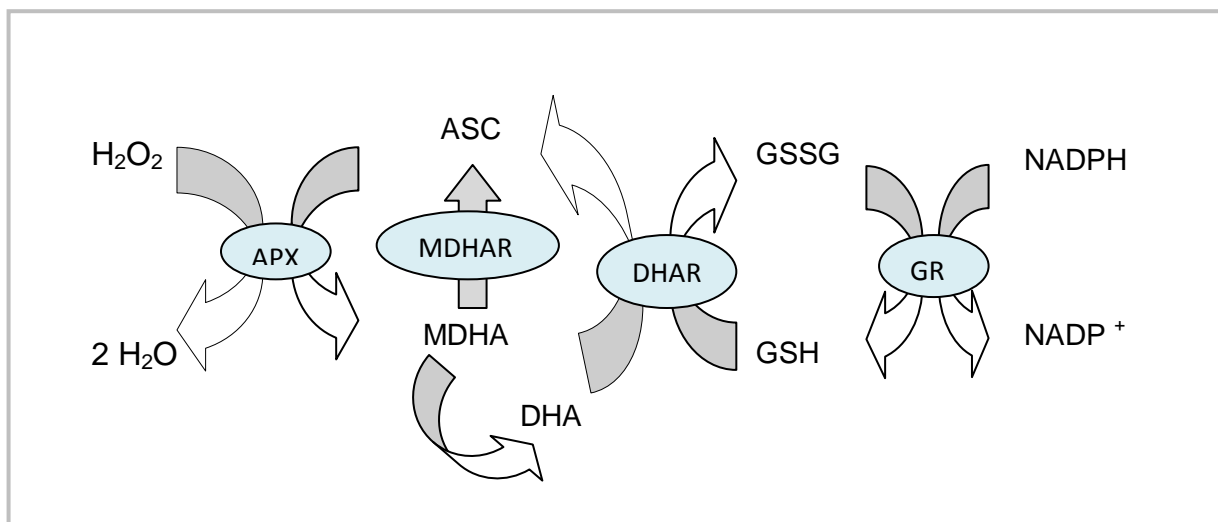


Figura 1. Ciclo glutatona-ascorbato. Adaptado de Blokhina et al., (2003).

A presença de glutatona-redutase nos cloroplastos garante a manutenção de níveis elevados de glutatona reduzida (GSH), importante para a regeneração do ascorbato (na forma reduzida). De acordo com Markovska et al. (2009), as quantidades relativas de ascorbato e H_2O_2 encontrados nas plantas *Brassica juncea* podem ser usadas para determinar a eficácia do ciclo glutatona-ascorbato (AGC). A razão entre ácido ascórbico e H_2O_2 são inferiores em plantas *B. juncea* tratadas com cádmio em comparação com o controle. Este mesmo estudo com brassicas mostrou um aumento significativo da actividade da glutatona redutase após o tratamento com cádmio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Neste trabalho foram realizados dois ensaios para estudar o efeito do cádmio no desenvolvimento das nabiças, um com plantas em hidroponia e o segundo com plantas em turfas. Para facilitar a apresentação do delineamento experimental primeiramente são apresentadas as características dos ensaios realizados em hidroponia e de seguida o ensaio em turfas. O ensaio em turfa serviu para avaliar o comportamento das plantas em condições controladas mais próximas de uma plantação real.

3.1.1. Local dos ensaios

Os ensaios decorreram numa câmara climatizada existente no Horto da Unidade de Investigação Química Ambiental do Instituto Superior de Agronomia.

Na câmara existe um painel de lâmpadas fluorescentes ligadas a um temporizador e a um aparelho de ar condicionado, o que permitiu controlar a exposição de luz, o fotoperíodo, a temperatura e a humidade relativa. Para o efeito, utilizou-se um fotoperíodo de 12 horas de luz, humidade relativa 65% e uma temperatura que variou entre 20 e 25°C.

3.1.2. Material Biológico

Para todos os ensaios realizados foram utilizadas sementes de nabiça (*Brassica rapa* var. *rapa*) fornecidas pela empresa Póvoa Semente.

3.1.3. Ensaio em hidroponia

Com o objectivo de obter material vegetal para as determinações que foram realizadas neste trabalho, foram realizados ensaios em hidroponia utilizando duas concentrações de cádmio (10 μM e 25 μM) havendo sempre amostras controlo (sem cádmio) para comparação.

3.1.3.1. Sementeira

Para a germinação das sementes, foram utilizados cilindros de turfa e tabuleiros em cada um dos ensaios decorridos.

Em cada tabuleiro foram introduzidos 20 cilindros de turfa, previamente humedecidos com água destilada, e em cada cilindro foram semeadas 5 ou 6 sementes.

Durante a germinação das sementes e de modo a garantir um adequado fornecimento de água, as turfas foram regadas com água destilada sempre que necessário. A germinação ocorreu volvidos 4 a 5 dias após a sementeira.

Em seguida são apresentadas as imagens (reduzida e ampliada) da fase de germinação das sementes (Figura 2).



Figura 2. Plantas de nabiça em fases iniciais de germinação.

3.1.3.2. Transplantação para hidroponia

Para a hidroponia, foram utilizados tabuleiros escuros, tampas de esferovite, tubos, bombas de arejamento, caixas com tampas de plástico e solução nutritiva – solução de Hoagland, cuja composição é descrita no Quadro 2.

Quadro2. Composição da solução nutritiva de Hoagland.

Composição da solução nutritiva em macronutrientes	Fórmula	Concentração μM	Concentração g/L
Nitrato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	6,0	1,42
Nitrato de potássio	KNO_3	6,0	0,61
Sulfato de magnésio	MgSO_4	2,5	0,62
Di-hidrofenofofato potássio	KH_2PO_4	1,0	0,14
Composição da solução nutritiva em micronutrientes	Fórmula	Concentração μM	Concentração g/L
Ácido bórico	H_3BO_3	100	6,18
Sulfato de manganês	MnSO_4	100	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO_4	30	8,63
Molibdato de sódio	Na_2MoO_4	1	0,24
Cloreto de cobalto	CoCl_2	0,1	0,02
Sulfato de cobre	CuSO_4	0,1	0,02
Etilenodiaminotetracetato de sódio e ferro	FeNaEDTA	75	27,53

Antes da transplantação das plantas para a hidroponia, as raízes foram cuidadosamente retiradas das turfas de modo a não serem danificadas. De seguida foram lavadas com água destilada para retirar os resíduos de turfa.

A solução nutritiva foi depositada no tabuleiro até que este ficasse cheio e as plantas inseridas nos orifícios das tampas de esferovite de modo a ficarem totalmente imersas na solução. Esta primeira transplantação ocorreu 7 dias após o início da germinação e as plantas permaneceram neste tabuleiro com tampa de esferovite por 10 dias, tempo necessário para atingirem as dimensões necessárias para serem transplantadas para caixas de plástico.

A seguir são apresentadas as fases de transplantação para hidroponia (Figura 3).

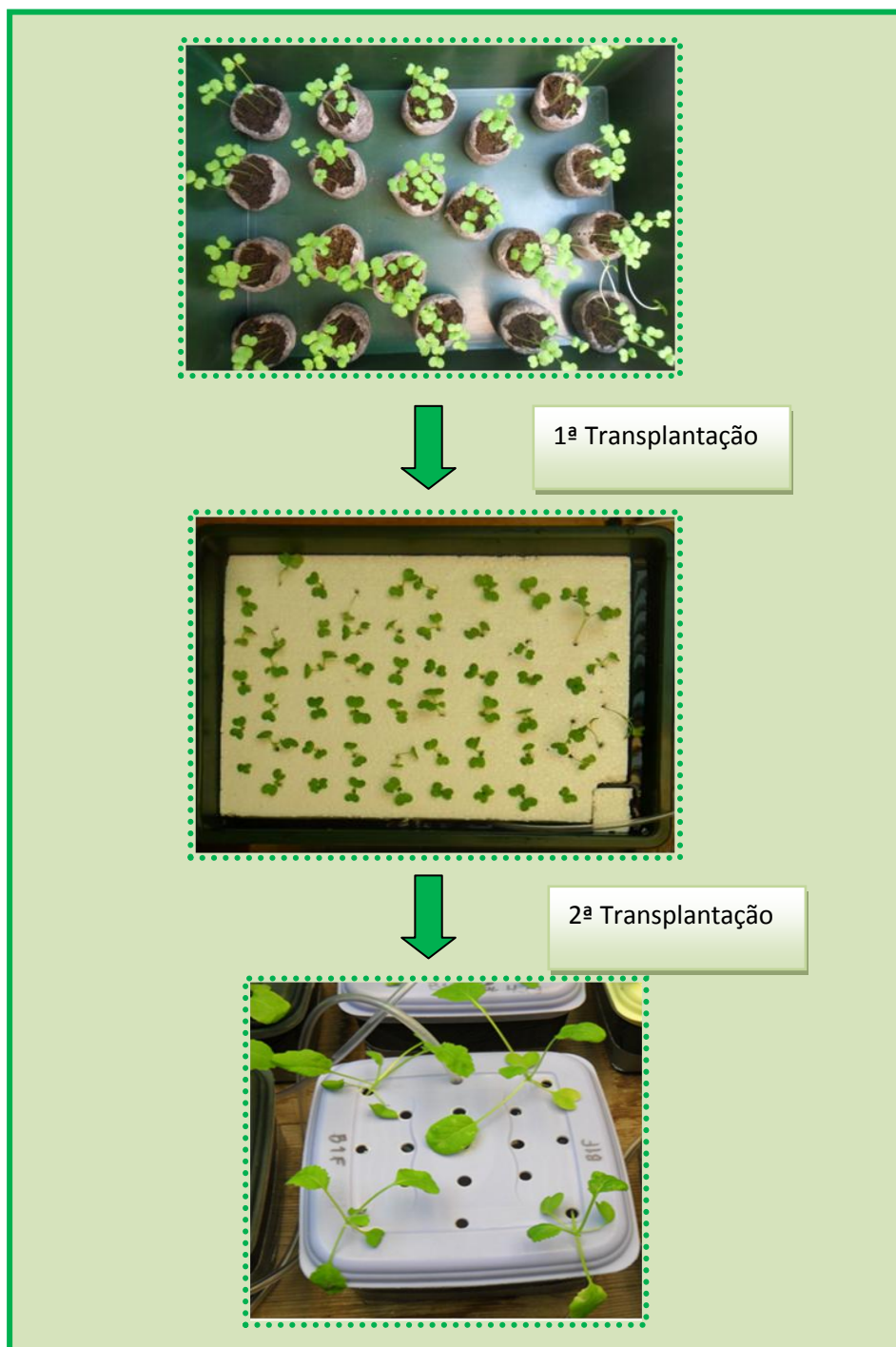


Figura 3. Fases da transplantação para hidroponia.

A segunda e última transplantação ocorreu 17 dias após o início da germinação, quando as plantas já estavam mais desenvolvidas. Nesta fase, estas foram transferidas do tabuleiro

que continha todas as plantas para caixas de plástico de 2 L de capacidade, cujas tampas foram previamente perfuradas para inserção das raízes, conforme apresentado na figura 3. Em cada caixa foram inseridas 4 plantas o mais homogêneas possível. Nas caixas foram adicionados 2 L de solução nutritiva de Hoagland. Posteriormente, instalou-se um sistema de arejamento para permitir uma dispersão adequada do oxigênio em toda a solução nutritiva.

Devido à elevada evaporação da solução nutritiva e ao seu consumo pelas plantas, o volume da solução foi monitorizado diariamente, sendo repostado sempre que necessário, de forma a garantir que as caixas estavam sempre com 2 L de solução nutritiva.

Quando as plantas apresentaram as dimensões adequadas (10 dias após a transplantação para as caixas) foi adicionado cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de modo a se obter uma concentração de cádmio de 10 μM ou de 25 μM , consoante o ensaio. Em todos os ensaios realizados foram mantidas plantas testemunhas, em solução nutritiva sem cádmio, para servirem de controlo face às contaminadas.

Em seguida é apresentada a imagem das plantas dentro da câmara (Figura 4).



Figura 4. Imagem das plantas na câmara climatizada.

Após um determinado tempo de exposição (Quadro 3) das plantas ao cádmio, foram colhidas plantas testemunhas e contaminadas para as determinações analíticas subsequentes.

Quadro 3. Quantidade de plantas retiradas nos ensaios realizados em solução nutritiva.

Amostras recolhidas	Condições	Nº de plantas	Condições	Nº de plantas
Dia 0	Controlo	4	Controlo	4
Dia 4	Controlo	4	Controlo	4
	10 μM de Cd	4	25 μM de Cd	4
Dia 6	Controlo	4	Controlo	4
	10 μM de Cd	4	25 μM de Cd	4
Dia 10	Controlo	4	Controlo	4
	10 μM de Cd	4	25 μM de Cd	4

As plantas desenvolvidas em hidroponia tratadas a 10 e 25 μ M, após estarem desenvolvidas e terem atingido o tempo de exposição ao cádmio pré-estabelecido (Dia 0, Dia 4, Dia 6 e Dia 10) foram colhidas para as determinações analíticas. Na figura 5, são apresentadas as imagens de algumas plantas colhidas para as determinações analíticas.

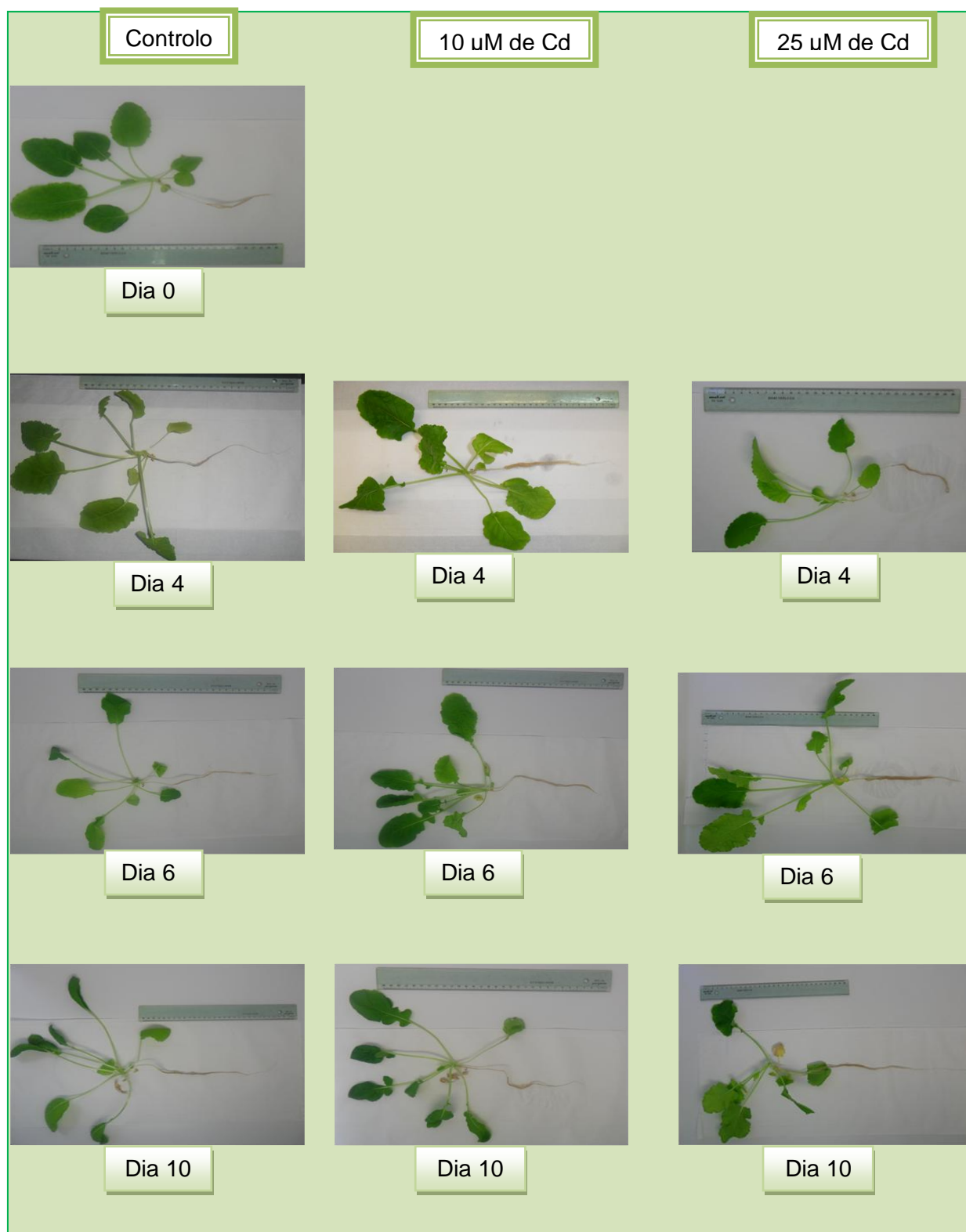


Figura 5. Exemplos de plantas recolhidas para as determinações analíticas.

3.1.4. Ensaio da rega em turfas

O ensaio em turfas foi realizado sob condições semelhantes aos ensaios em hidroponia - mesmo local, material vegetal e tipo de sementeira.

Na sementeira a diferença foi na quantidade de cilindros de turfa, foram utilizados 36 turfas previamente humedecidas e por turfa foram dispostas 2 sementes. As turfas foram humedecidas com água destilada, quando necessário, de modo a garantir um adequado fornecimento de água para a germinação das sementes.

A germinação ocorreu volvidos 4 a 5 dias após a sementeira. Após a germinação as plantas foram regadas com água destilada durante 28 dias até estarem mais desenvolvidas.

Como suporte para as plantas poderem crescer umas ao lado das outras, foram adaptados copos de plástico sem o fundo. Antes de adaptar os copos às turfas, foram retiradas de cada turfa uma planta (com pior aspecto), de modo a permanecer na turfa apenas a planta a ser utilizada no ensaio.

Quando as plantas apresentaram as dimensões adequadas, cerca de 28 dias após a germinação, iniciou-se a rega com solução nutritiva de Hoagland contendo 10 μM de cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

A colheita das plantas contaminadas pela rega ocorreu semanalmente e durante 9 semanas consecutivas.

A seguir são apresentadas imagens das fases de desenvolvimento das plantas em turfas (Figura 6).

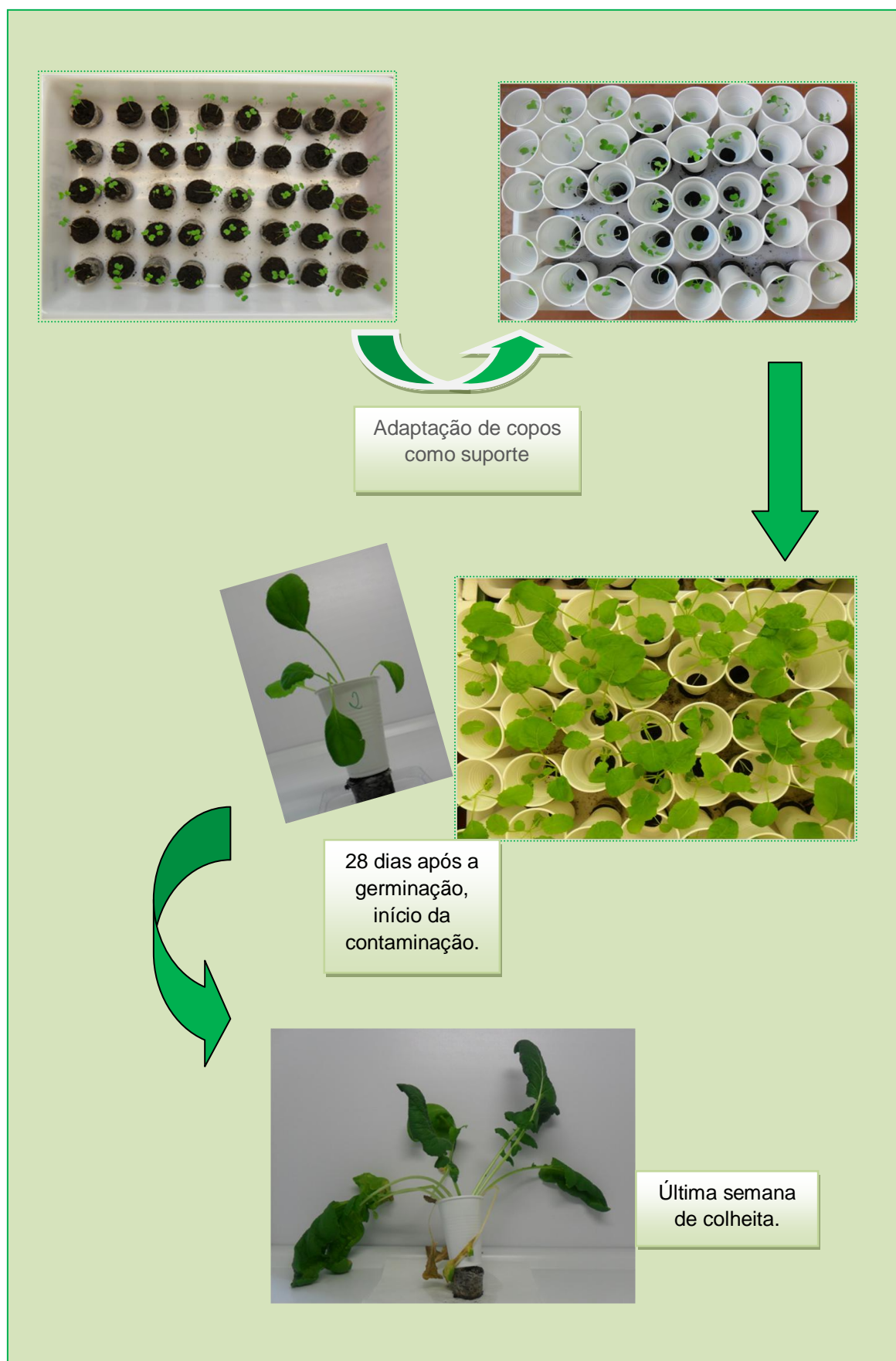


Figura 6. Fases de desenvolvimento das plantas em turfas.

3.2. Determinações Analíticas

3.2.1. Determinação do teor de matéria seca

O teor de matéria seca foi obtido através dos valores de massa fresca e seca das folhas e raízes. A massa seca (MS) das folhas e raízes foi determinada após secagem em estufa a 80-90°C até a massa constante (aproximadamente 7 dias).

Com as massas (fresca e seca) determinadas foi possível obter o teor de massa seca, em percentagem através da expressão: $\%MS = MS \times 100/MF$.

3.2.2. Determinação dos elementos minerais

As amostras de parte aérea e de raízes secas foram maceradas manualmente até se tornarem pó. Nessa etapa, verificou-se que a quantidade de massa seca das raízes era insuficiente para efectuar a determinação dos elementos minerais, por isso realizou-se apenas as determinações em folhas.

O ensaio em turfas contaminadas com cádmio também foi utilizado para a determinação dos elementos minerais, sendo que neste, além das folhas aproveitou-se também as turfas utilizadas pelas plantas. As raízes não foram aproveitadas por não existirem em quantidades suficientes para as determinações. As turfas também foram armazenadas em estufa a 80-90°C até a massa constante.

Das amostras secas retirou-se entre 0,3 a 0,5 g para tubos de teflon do equipamento de microondas (CEM MDS 2000) e adicionou-se a cada tubo 5 mL de ácido nítrico (HNO₃). Efectuou-se o procedimento de digestão no microondas, utilizando um programa adequado e, após a digestão, diluíram-se as amostras para balões de 25 mL com água destilada.

A seguir são apresentadas as imagens do microondas utilizado e de algumas amostras preparadas para a extracção (Figura 7).



Figura 7. Imagens do microondas (CEM MDS 2000) utilizado para a digestão.

As concentrações de cádmio (Cd), foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite, as concentrações de sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), Zinco (Zn), manganês (Mn), ferro (Fe) e cobre (Cu), foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica de chama (Unicam Solaar M).

3.2.3. Preparação das amostras para as determinações do nível de peroxidação de lípidos e do peróxido de hidrogénio (H₂O₂)

Todas as amostras de raízes foram lavadas com solução 5 mM de CaCl₂ durante 10 minutos para retirar o Cd extracelular. As folhas foram cortadas para retirar a nervura principal. De seguida, as folhas e as raízes foram congeladas em azoto líquido e armazenadas em arca congeladora a -80°C, pois o tempo não era suficiente para fazer as colheitas e determinações no mesmo dia. Assim sendo, as determinações eram sempre realizadas um dia após a colheita das amostras.

Estas duas determinações foram feitas sempre com um mínimo de 5 repetições, para se obter uma média de valores o mais representativa possível do material analisado.

3.2.3.1. Determinação do nível de peroxidação de lípidos

Para a determinação dos níveis de peroxidação de lípidos foi utilizado o método descrito em Demiral & Türkan (2005), que se baseia na determinação do malondialdeído (MDA) formado.

Pesaram-se cerca de 0,5 g de amostra (folhas / raízes) congeladas em azoto, para posteriormente se proceder à maceração, utilizando 2,5 mL de ácido tricloroacético 0,1 % m/V (TCA) como solução extractante. A amostra macerada com TCA foi centrifugada durante 15 minutos a 10000 x g. De seguida retirou-se para um tubo 1 mL de sobrenadante, juntando-se 4 mL de solução ácido tricloroacético (TCA) 20% m/V, contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% m/V. Os tubos foram aquecidos a 95 – 100°C durante 30 minutos e depois arrefecidos rapidamente em banho de gelo. A mistura já arrefecida foi novamente centrifugada durante 15 minutos a 10000 x g e de seguida foi feita a leitura da absorvância a 532 nm e a 600 nm no espectrofotómetro (figura 8).

A concentração do malondialdeído formado foi expressa em nm, correspondendo a:

$$\text{Concentração de MDA} = (\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}) / 155,10$$

3.2.3.2. Determinação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂)

A determinação do teor de H₂O₂ formado baseou-se no método descrito por Singh et al. (2006).

Pesaram-se cerca de 0,5 g de amostra (folhas / raízes) congeladas em azoto, para posteriormente se proceder à maceração, utilizando 2,5 mL de ácido tricloroacético 0,1 % m/V (TCA) como solução extractante. A amostra macerada com TCA foi centrifugada durante 15 minutos a 10000 x g. De seguida retirou-se para um tubo 0,5 mL de sobrenadante, juntando-se 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,6) e 1 mL de solução de iodeto de potássio (1 M). Agitaram-se os tubos e as amostras foram transferidas para cuvetes sendo levadas imediatamente para a leitura da absorvância a 390 nm, no espectrofotómetro (figura 8).



Figura 8. Espectrofotômetro (Hitachi U-2000 UV/Vis Spectrophotometer).

A quantificação do teor de H_2O_2 das amostras lidas no espectrofotômetro, foi feita com base na curva padrão construída:

$$(\text{H}_2\text{O}_2 = \text{Abs} / 0,0853)$$

A seguir é apresentado o Quadro 4, que indica as soluções utilizadas na preparação da curva padrão.

Quadro 4. Soluções utilizadas na construção da curva padrão que correlaciona os valores de absorvância com os teores de H_2O_2 das amostras lidas no espectrofotômetro.

[H_2O_2] ($\mu\text{g/mL}$)	Solução 0,16 mM H_2O_2 (μL)	Solução Tampão fosfato 100 mM, pH 7,6 (μL)	Solução 1 M KI (μL)
0	0	1000	1000
1,1	100	900	1000
2,2	200	800	1000
3,3	300	700	1000
4,4	400	600	1000
5,5	500	500	1000

3.2.4. Determinação da clorofila, carotenóides e antocianinas

A determinação da clorofila, carotenóides e antocianinas foi realizada utilizando amostras de folhas (Dia 0, Dia 4, Dia 6 e Dia 10) com concentrações de cádmio 0 μM , 10 μM e 25 μM congeladas em azoto líquido.

De cada amostra retirou-se para cadinhos 0,06 g de folhas que foram imediatamente maceradas com 10 mL de solução acetona/Tris (80:20), sendo de seguida centrifugadas a 10000xg durante 15 min, com a temperatura de 6°C. O sobrenadante foi retirado para cuvets de vidro e realizou-se a leitura da absorvância em espectrofotómetro a 470, 537, 647 e 663 nm. A partir dessas leituras, determinou-se a concentração de clorofilas a, b e totais por meio de equações propostas por Sims & Gamon (2002):

$$\text{Clorofila } \underline{a} \text{ (}\mu\text{mol mL}^{-1}\text{)} = 0,01373 A_{663} - 0,000897 A_{537} - 0,003046 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } \underline{b} \text{ (}\mu\text{mol mL}^{-1}\text{)} = 0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663}$$

$$\text{Clorofila } \underline{\text{total}} \text{ (}\mu\text{mol mL}^{-1}\text{)} = \text{clorofila } \underline{a} + \text{clorofila } \underline{b}$$

$$\text{Antocianinas (}\mu\text{mol mL}^{-1}\text{)} = 0,08173 A_{537} - 0,00697 A_{647} - 0,002228 A_{663} \text{ (Valor corrigido com a extracção e determinação obtida especificamente para antocianinas, conforme é explicado em Sims \& Gamon (2002).}$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{mol mL}^{-1}\text{)} = (A_{470} - (17,1 \times (\text{clorofila } \underline{a} + \text{clorofila } \underline{b}) - 9,479 \times \text{antocianinas})) / 119,26.$$

Os teores de clorofilas, carotenoides e antocianinas obtidos, foram expressos em função do peso de folha fresca ($\mu\text{M.mL}^{-1}.\text{mg}^{-1}$), segundo sugestão de Sims & Gamon (2002).

3.2.5. Determinação de clorofila (Correlação Valor Hansatech e teor de clorofila)

Para a determinação da clorofila foram colhidas 15 folhas frescas de nabiça com tonalidades que variavam de verde amarelado a verde-escuro. Em quatro pontos de cada folha, foram feitas leituras utilizando o medidor portátil de clorofila Hansatech, procedendo-se ao cálculo da média das leituras por folha.

Em cada folha, nos mesmos pontos onde foram feitas as leituras com o Hansatech retirou-se 0,06 g de amostra. As 4 amostras retiradas de cada folha, foram imediatamente maceradas com 10 mL de solução acetona/Tris (80:20). Sendo de seguida centrifugadas a 10000xg durante 15 min, com a temperatura de 6°C. O sobrenadante foi retirado para cuvets de vidro e realizou-se a leitura da absorvância em espectrofotómetro a 470, 537, 647 e 663 nm. A partir dessas leituras, determinou-se a concentração de clorofilas a, b e totais por meio de equações propostas por Sims & Gamon (2002), conforme mencionado em no ponto 3.2.4.

Os teores de clorofilas obtidos foram expressos em função da área foliar ($\text{mg.mL}^{-1}.\text{m}^2$) e massa de folha fresca ($\mu\text{M.mL}^{-1}.\text{mg}^{-1}$), segundo sugestão de Sims & Gamon (2002).

3.3. Tratamento Estatístico

O tratamento estatístico dos dados consistiu numa análise de variância a um factor (ANOVA), para avaliar o efeito das diferentes concentrações de cádmio nas amostras de nabiça. Para este efeito, utilizou-se o teste de Tukey (software “SPSS Statistics 17.0”) para comparação das médias, a um nível de significância de 95%.

Para indicar as médias onde há diferenças significativas utilizaram-se letras maiúsculas e minúsculas.

Nos resultados do ensaio em hidroponia, as letras maiúsculas indicam se existem ou não diferenças significativas quando se compararam tempos diferentes com concentrações de cádmio iguais. Já as letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas quando foram comparadas concentrações diferentes de cádmio num mesmo tempo de exposição.

Nos resultados do ensaio em turfa, optou-se por comparar as diferenças entre cada uma das semanas com a semana 0, utilizando asterisco para indicar as diferenças significativas.

Nos dois ensaios, os gráficos de biomassa e peso seco não apresentam barras de erro e nem tratamento estatístico por terem sido obtidos por valores únicos e não por médias de valores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados da hidroponia

4.1.1. Análise dos elementos minerais

Além do cádmio, elemento mineral escolhido para induzir a toxicidade neste trabalho, foram analisadas também as concentrações de outros elementos minerais presentes nas plantas, sendo eles o sódio (Na), o potássio (K), o cálcio (Ca), o magnésio (Mg), o zinco (Zn), o manganês (Mn), o ferro (Fe) e o cobre (Cu).

Com exceção do cobre, que não foi detectado nas plantas analisadas (abaixo do limite de detecção da espectrofotometria atômica de chama), as concentrações dos elementos mencionados acima estão apresentadas nos gráficos seguintes (Figuras 9 à 16). Em todos estes gráficos foi comparada a influência do cádmio em relação a concentração destes outros minerais presentes nas plantas de nabiça.

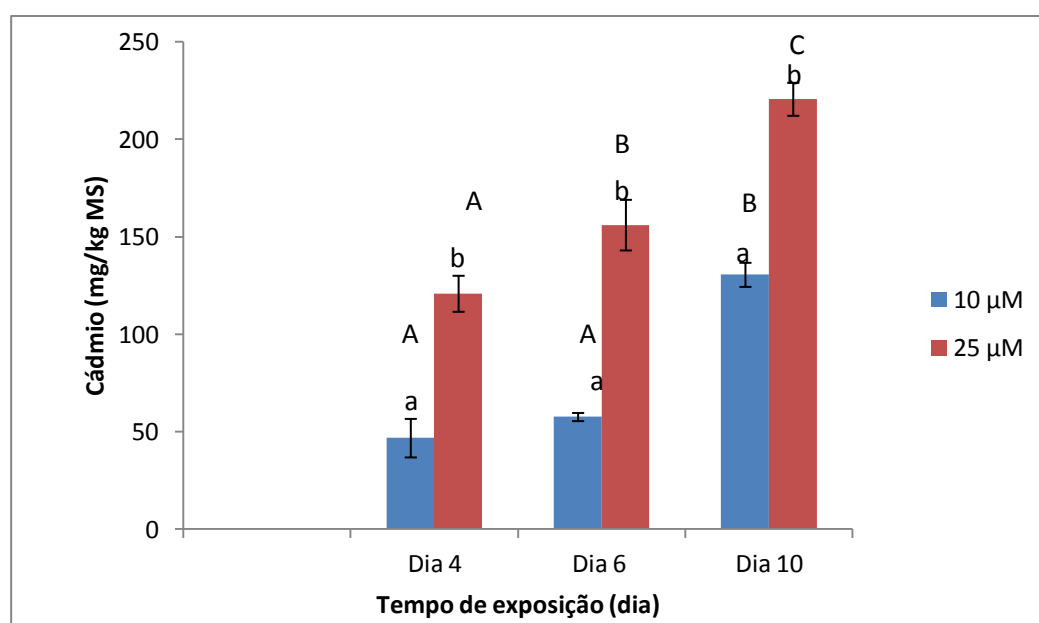


Figura 9. Teor de cádmio nas folhas - Ensaio em hidroponia.

Como já era previsto, observa-se na figura 9, que a concentração de cádmio aumentou ao longo do tempo de exposição e com o aumento da concentração de cádmio na solução nutritiva. A concentração máxima de cádmio obtida após os 10 dias de exposição a concentração de 25 µM de Cd foi de 220,6 mg/kg MS que corresponde a 17,5 mg/kg MF, valor superior ao estabelecido por lei para produtos hortícolas de folha.

Segundo Baker & Brooks, (1989), as plantas que acumulam mais de 100 mg/kg de Cd em suas folhas são definidas como hiperacumuladoras de Cd. Neste estudo, verifica-se que a nabiça acumulou mais de 200 mg/kg de cádmio nas folhas, valor superior ao estabelecido por Baker & Brooks, (1989), comprovando a elevada capacidade de absorver e transportar cádmio para a parte aérea como fazem as espécies hiperacumuladoras.

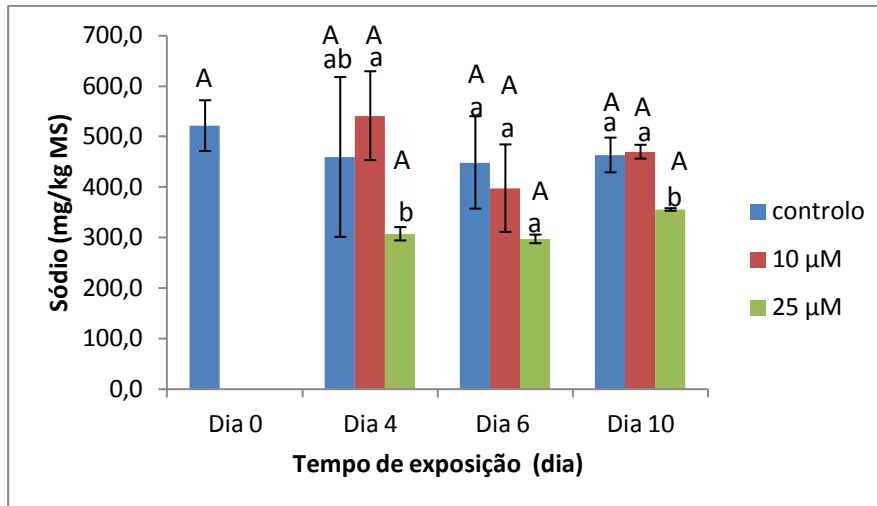


Figura 10. Teor de sódio nas folhas - Ensaio em hidroponia.

Na figura 10, observa-se que não ocorreram diferenças significativas na concentração de sódio ao longo do tempo entre concentrações de cádmio iguais. Entre concentrações de cádmio diferentes a concentração de sódio apresentou diferenças significativas nos dias 4 e 10, tendo-se observado uma diminuição dos teores de Na nas plantas contaminadas com 25 µM de Cd.

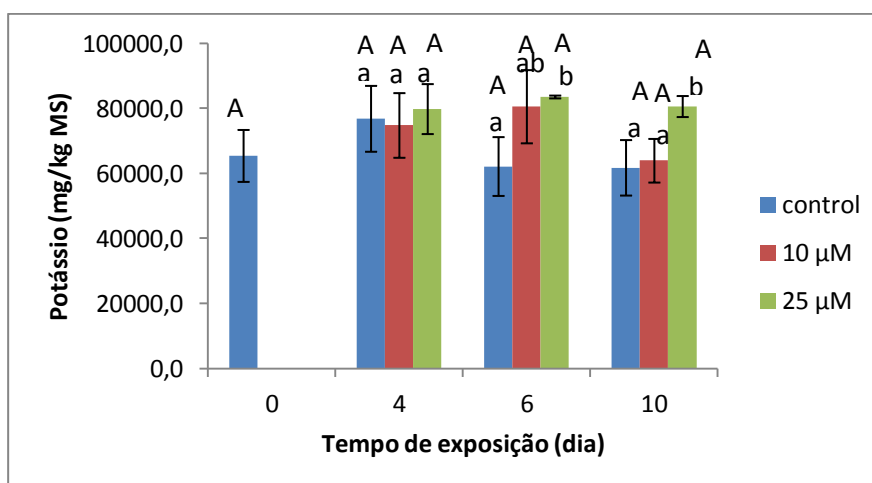


Figura11. Teor de potássio nas folhas - Ensaio em hidroponia.

No presente estudo, como se pode observar na figura 11, a adição de cádmio na solução nutritiva influenciou significativamente o teor de potássio nas folhas, tendo-se observado um aumento significativo nos teores de K nas plantas contaminadas com 25 μM de Cd a partir do 6º dia de exposição. Estes resultados estão de acordo com Jiang et al (2003) que apresenta aumento no teor de K em brassicas que foram expostas ao cádmio.

Estudos em arroz indicam que a adição de cádmio influenciou significativamente o conteúdo de potássio (Wang-da et al, 2009).

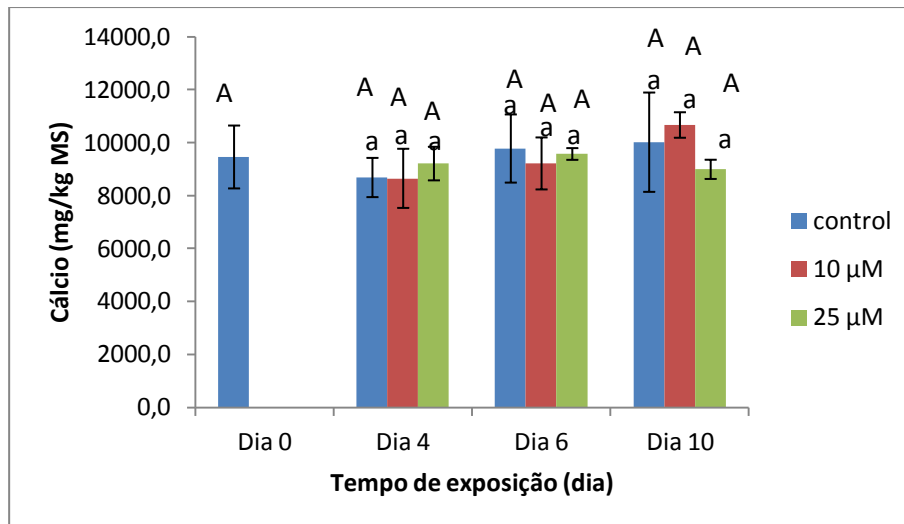


Figura 12. Teor de cálcio nas folhas - Ensaio em hidroponia.

Na figura 12, observa-se que a adição de cádmio até 25 μM na solução nutritiva não influenciou significativamente o teor de cálcio nas folhas.

Estudos do efeito do cádmio sobre o crescimento de plântulas de milho sugerem que o cálcio pode neutralizar os efeitos tóxicos do Cd no que se refere ao crescimento da plântula. Greger & Bertell (1992) sugerem que o grau de inibição do crescimento de plantas causado por Cd, depende do nível de Ca presente no meio de cultura e no tecido vegetal. Malkowski et al (2005), indicam que em plântulas de milho expostas ao cádmio, a concentração de cálcio nas raízes foi 3 vezes maior em comparação com a solução controlo (sem cádmio).

Wang et al.(1992) sugeriram que uma forte interacção entre Ca e constituintes da parede celular pode ser importante no fornecimento de Ca suficiente para manter a integridade da membrana plasmática. Um aumento da concentração de cálcio em situações de stress induzido por cádmio é um possível mecanismo para reduzir os efeitos tóxicos do Cd. Uma redução na concentração de cálcio sob a toxicidade do cádmio pode indicar um sistema de defesa intercelular danificado.

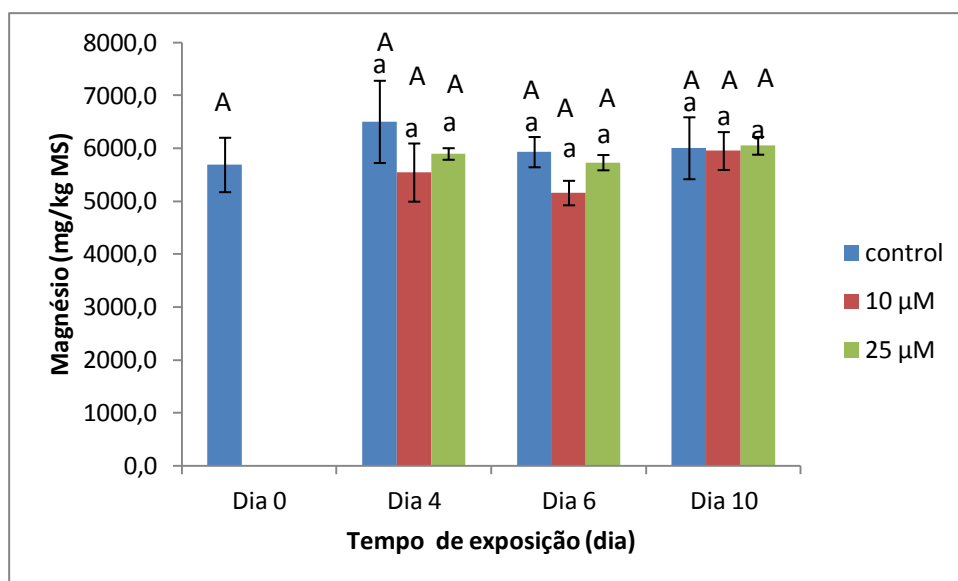


Figura 13. Teor de magnésio nas folhas – Ensaio em hidroponia.

Na figura 13, observa-se que a adição de cádmio na solução nutritiva não influenciou significativamente o teor de magnésio nas folhas.

Em folhas de mostarda da Índia (*Brassica juncea*), as concentrações de magnésio aumentaram ligeiramente com o aumento da concentração de cádmio (Jiang et al, 2003)

A acumulação de cálcio e magnésio nas folhas contaminadas por cádmio em relação ao controlo (tratamento sem cádmio) sugere que o Ca e o Mg foram eficazmente absorvidos pela planta, podendo indicar que o sistema de defesa intracelular está em bom funcionamento.

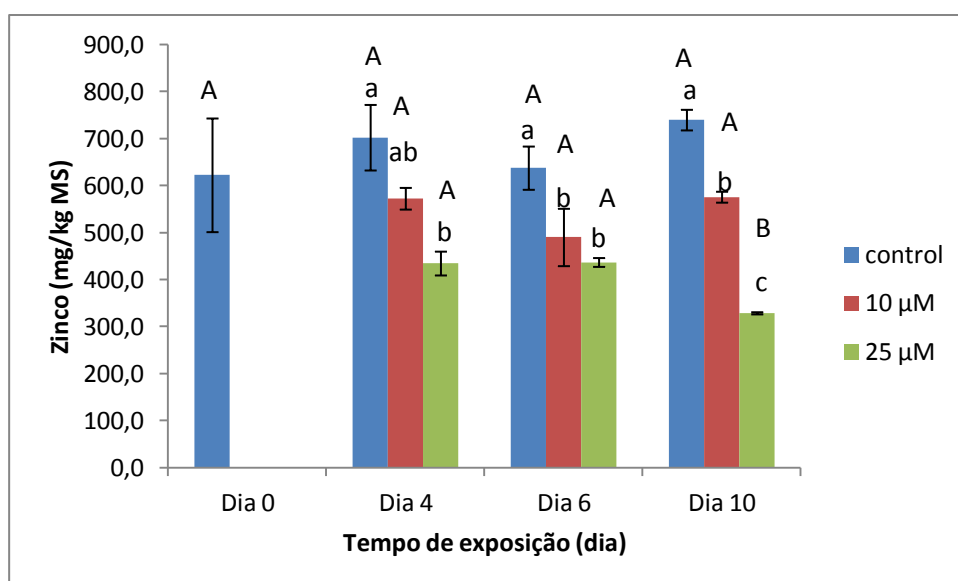


Figura 14. Teor de zinco nas folhas – Ensaio em hidroponia.

Na figura 14, observa-se que a adição de cádmio principalmente a 25 μM na solução nutritiva, reduziu significativamente o teor de zinco nas folhas. Isto mostra que há uma aparente competição da absorção de Zn pela planta em relação ao Cd, ou que o transporte do Zn para a parte aérea está a ser afectado. Deste modo, as folhas de nabiça que crescem na presença de Cd, contêm um teor reduzido de zinco.

Estudos em milho, tomate, sorgo e cevada, indicam que a adição de cádmio reduziu significativamente as concentrações de zinco na parte aérea destas planta (Wang-da et al, 2009). No entanto, há relatos que contraditórios sobre a relação do Cd e Zn, que indicam uma relação sinérgica entre estes minerais (Moraghan, 1993).

Estudos em *Brassica juncea*, relatam que o cádmio pode ter afectado a absorção do zinco, mas não o transporte dentro da planta.

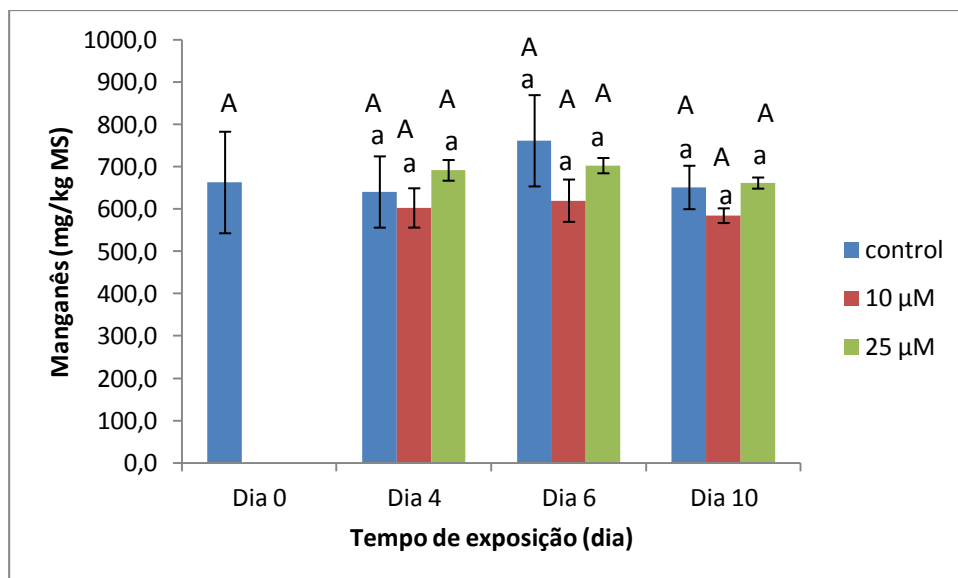


Figura 15. Teor de manganês nas folhas - Ensaio em hidroponia.

Na figura 15, observa-se que a adição de cádmio na solução nutritiva não influenciou significativamente o teor de manganês nas folhas, o que também foi verificado em *Brassica juncea* (Jiang et al, 2003).

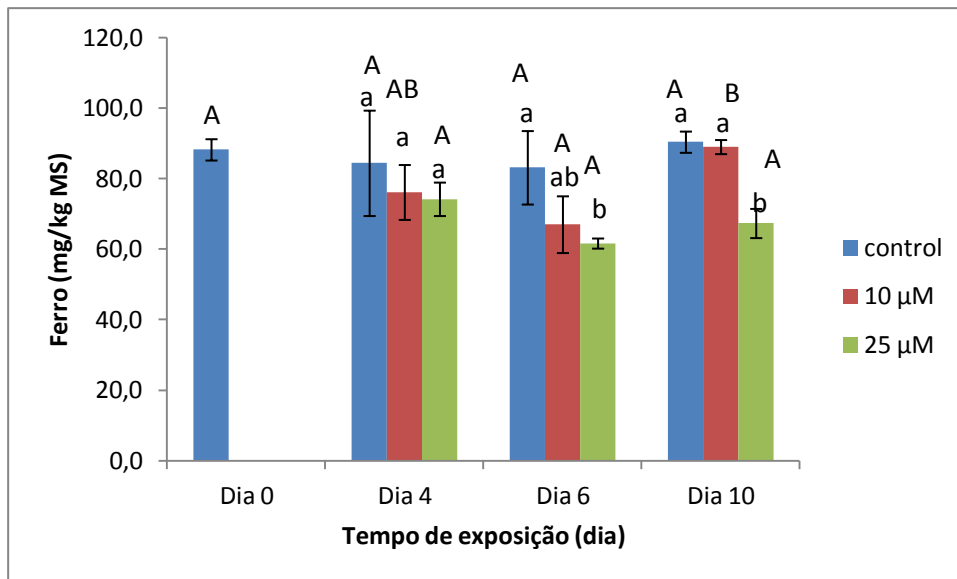


Figura 16. Teor de ferro nas folhas - Ensaio em hidroponia.

Na figura 16, observa-se que a adição de cádmio a 25µM na solução nutritiva influenciou significativamente o teor de ferro nas folhas expostas durante mais de 6 dias. Tal como no caso do zinco, também parece existir competição entre a absorção (ou o transporte) do Cd e do Fe.

Clemens 2006, menciona que o sistema de absorção do ferro está regulado de maneira que permite a entrada de cádmio através da sua via de transporte.

Estudos em *Brassica juncea*, indicaram que os nutrientes principalmente afectados por Cd na parte aérea foram, K e Ca. Neste estudo em *Brassica rapa* var. *rapa*, os nutrientes principalmente afectados por Cd foram, Zn, Fe, K e Na.

Comparando o teor mineral de *B. rapa* no ensaio em hidroponia, verifica-se que os elementos Ca, Mg e Mn não foram afectados pelo cádmio em nenhuma das concentrações utilizadas no ensaio em hidroponia. Verificou-se também que as plantas expostas a maiores concentrações de cádmio (25µM), apresentaram menores concentrações de Zn, Fe e Na. Podendo sugerir que houve competição na absorção ou transporte entre estes minerais e o Cd pelas plantas.

Para obter maiores conclusões no que se refere à influência do Cd sobre estes minerais, seria necessário repetir os ensaios utilizando mais plantas para ter raízes em quantidades suficientes para as determinações dos elementos minerais. Comparando os resultados das raízes e folhas seria possível verificar a mobilização dos minerais nas plantas.

4.1.2. Avaliação dos efeitos do cádmio quanto aos aspectos fisiológicos

A *B. rapa*, apresentou respostas fisiológicas relativamente heterogêneas no que se refere à cor das folhas, sendo no entanto observados sintomas visíveis de toxicidade ao cádmio em algumas plantas analisadas após o 10º dia de exposição ao cádmio (25µM), como a ocorrência de clorose e manchas brancas nas folhas. No entanto, observaram-se algumas variações entre as diversas plantas. Na figura 5, estão apresentadas as imagens de algumas plantas analisadas.

4.1.2.1. Biomassa e matéria seca

Devido a insuficiência de raízes em quantidade suficiente optou-se por apresentar os resultados de biomassa e peso seco apenas referentes às folhas.

A seguir são apresentados os resultados da biomassa e o peso seco das folhas (Figuras 17 e 18) correspondentes ao ensaio em hidroponia.

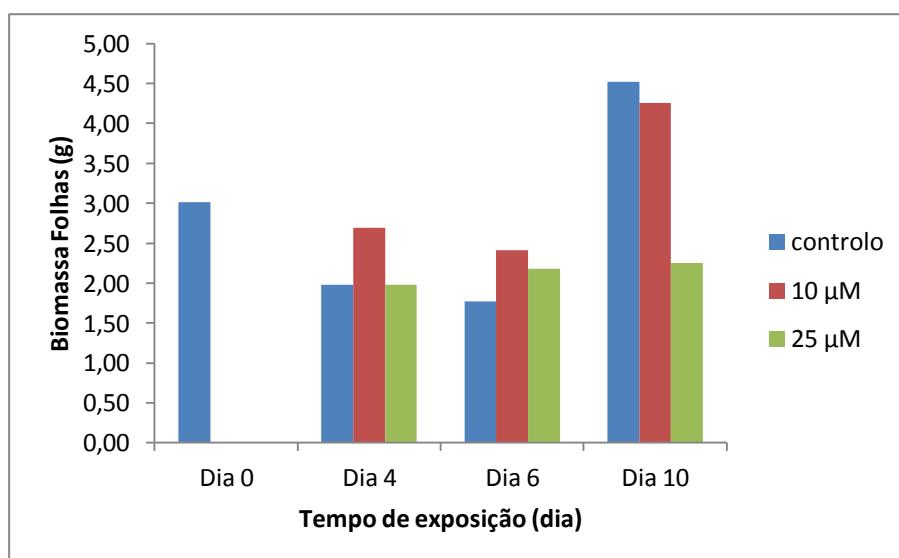


Figura 17. Biomassa das folhas - Ensaio em hidroponia.

Na figura 17, observa-se que com o aumento da concentração de cádmio, houve uma redução na produção de biomassa, mas só a partir do décimo dia. Os elevados valores de biomassa obtidos no dia 10 podem ser justificados pela heterogeneidade das amostras, pois as plantas mesmo antes de serem contaminadas já apresentavam diferenças de desenvolvimento mesmo estando sob as mesmas condições. Nos dias 4 e 6 não se

observaram grandes diferenças, também porque a variabilidade das plantas era relativamente grande.

Para se obter resultados com conclusões mais significativas seria necessário repetir cada ensaio utilizando uma quantidade maior de plantas para tentar minimizar a heterogeneidade das amostras.

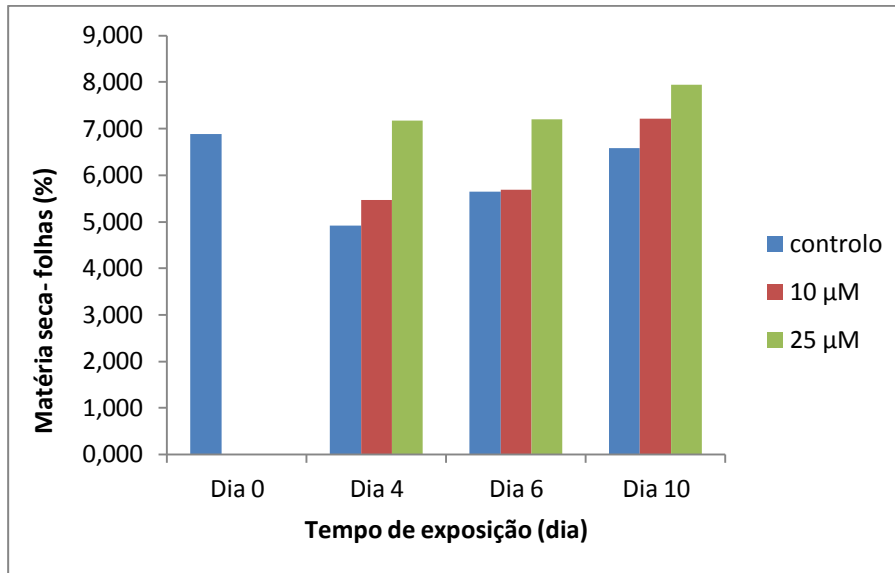


Figura 18. Teor de matéria seca das folhas em percentagem - Ensaio em hidroponia.

Na figura 18, observa-se que a percentagem do teor de matéria seca das folhas teve um aumento aparente porque a quantidade de água absorvida diminuiu, o que indica que o cádmio pode ter afectado a absorção de água pelas plantas.

Estudos em *B. juncea*, apresentaram resultados diferentes, a biomassa das folhas expostas a tratamentos com cádmio (10 – 190 mg Cd kg⁻¹) não apresentou redução em nenhuma das concentrações utilizadas no ensaio. A matéria seca das folhas diminuiu com o aumento das concentrações de cádmio (Jiang et al, 2003).

4.1.2.2. Comprimento da parte aérea

O comprimento da parte aérea da nabiça é apresentado no gráfico a seguir (Figura 19).

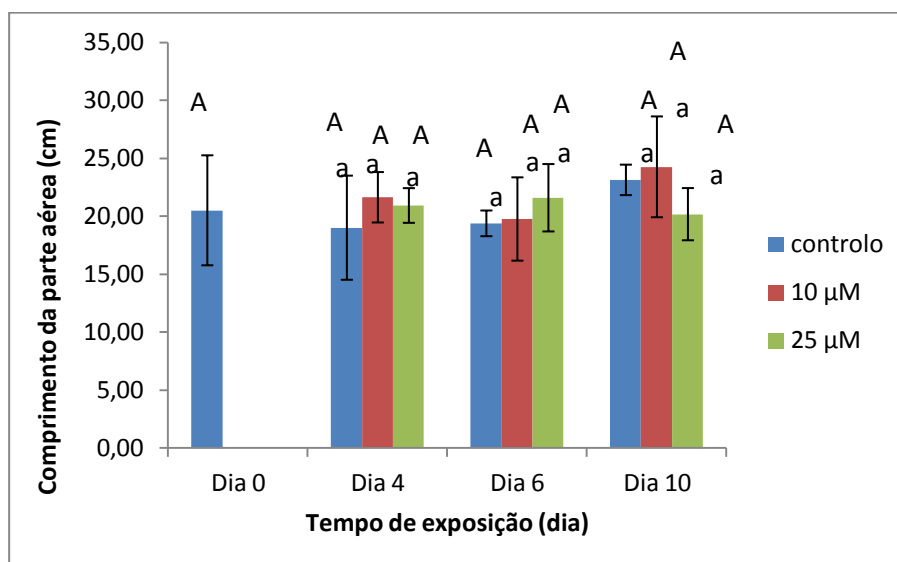


Figura 19. Comprimento da parte aérea das plantas - Ensaio em hidroponia.

As plantas estudadas apresentaram uma enorme heterogeneidade quanto ao comprimento da parte aérea, sendo observada ao longo do ensaio uma tendência de redução do comprimento da parte aérea com o aumento da concentração de Cd. No entanto na figura 19, observa-se que essa heterogeneidade nos comprimentos da parte aérea não apresentou diferenças significativas.

4.1.2.3. Comprimento das raízes

A seguir é apresentado o gráfico (Figura 20) com os valores do comprimento das raízes do ensaio em hidroponia.

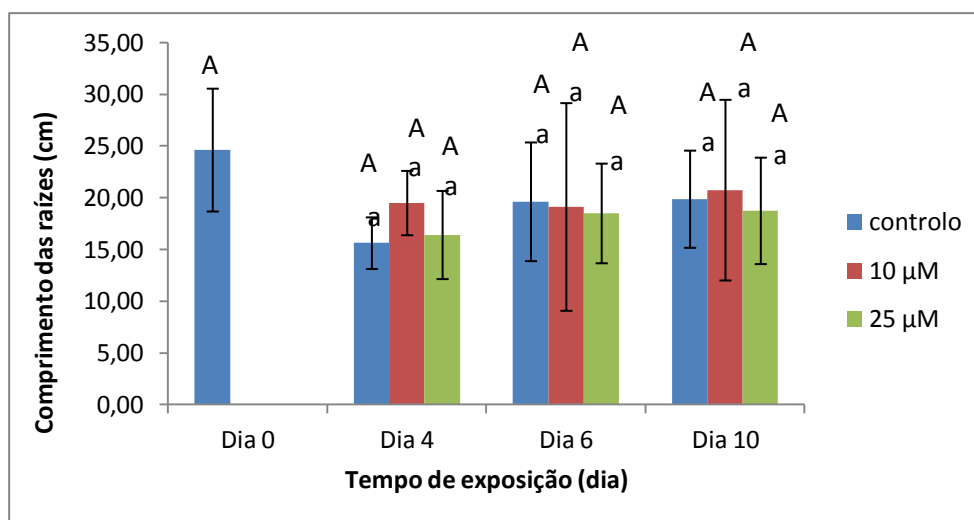


Figura 20. Comprimento das raízes das plantas - Ensaio em hidroponia.

O comprimento das raízes das plantas desenvolvidas em hidroponia, também não demonstrou ser afectado pelas concentrações de cádmio utilizadas.

Estudos em *B. juncea*, indicaram que o crescimento das plantas foi afectado negativamente com o cádmio (Jiang et al, 2003).

Os resultados do comprimento da parte aérea e das raízes da *B. rapa*, seriam mais significativos se tivesse sido utilizada uma amostragem maior de plantas, o que poderia reduzir as enormes barras de erro obtidas nestes gráficos.

4.1.2.4. Número de folhas

No gráfico a seguir são apresentadas as médias dos números de folhas existentes por planta analisada.

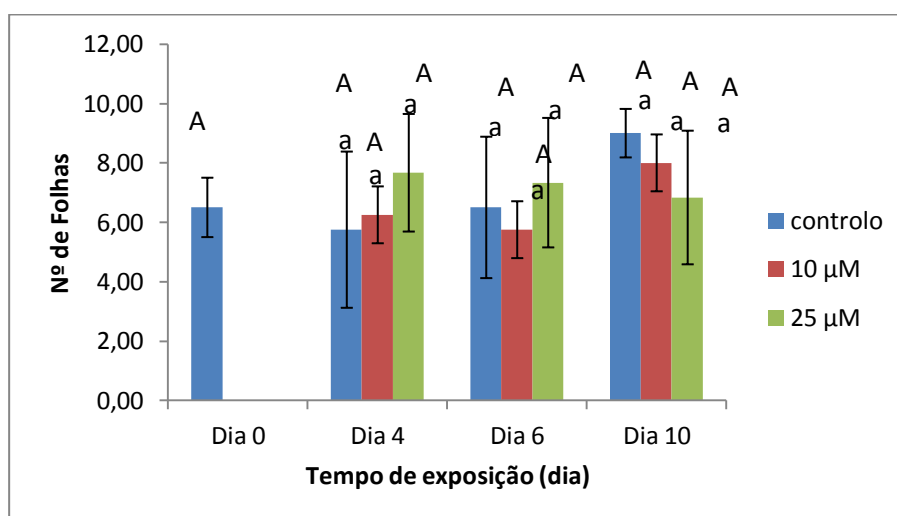
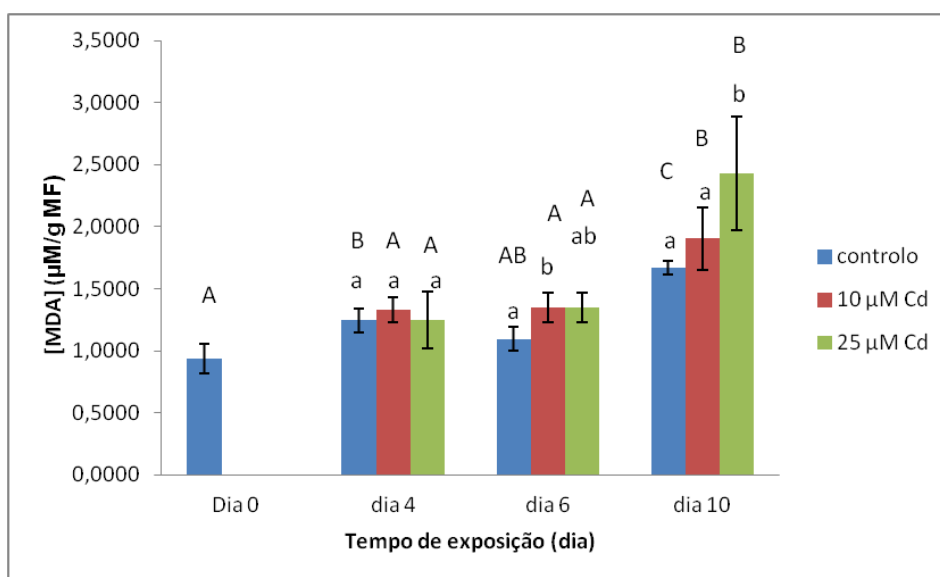


Figura 21. Número de folhas por planta - Ensaio em hidroponia.

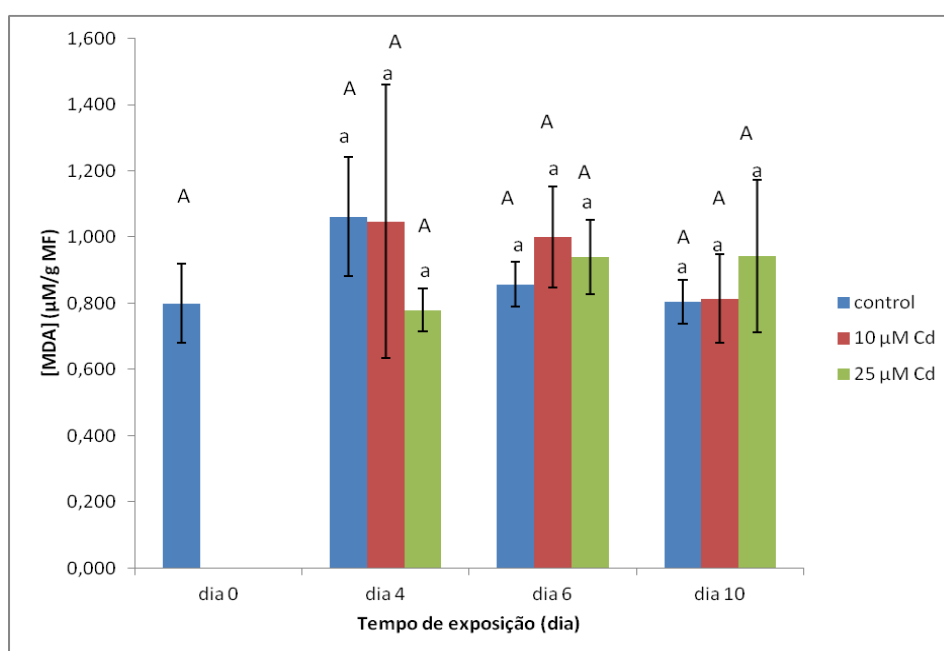
Na figura 21, observa-se que o número de folhas por planta segue uma tendência em aumentar ao longo do tempo, o que pode ser facilmente explicado pelo facto de que a planta ainda estava em plena fase de desenvolvimento. Contudo observando a análise estatística do número de folhas por planta, verifica-se que as diferenças não foram significativas.

4.1.3. Avaliação do efeito do cádmio na peroxidação dos lípidos

Os níveis de peroxidação dos lípidos nas folhas e raízes analisadas, medidos através dos teores de MDA, são apresentados nas figuras 22.



(a)



(b)

Figura 22. Concentração média de malondialdeído (MDA) formado em folhas (a) e raízes (b), após exposição ao cádmio em hidroponia.

Observa-se na figura 22 que o teor de MDA nas folhas aumentou significativamente após 10 dias de exposição ao cádmio, principalmente para a concentração 25 µM de Cd, atingindo concentrações de MDA na ordem dos 2,4 µM/g MS.

Nas raízes, observa-se que as concentrações de MDA são inferiores às das folhas. No entanto as raízes mesmo não apresentando concentrações tão elevadas de MDA como as folhas, indicam uma tendência similar a estas, aumentando sua concentração em MDA após

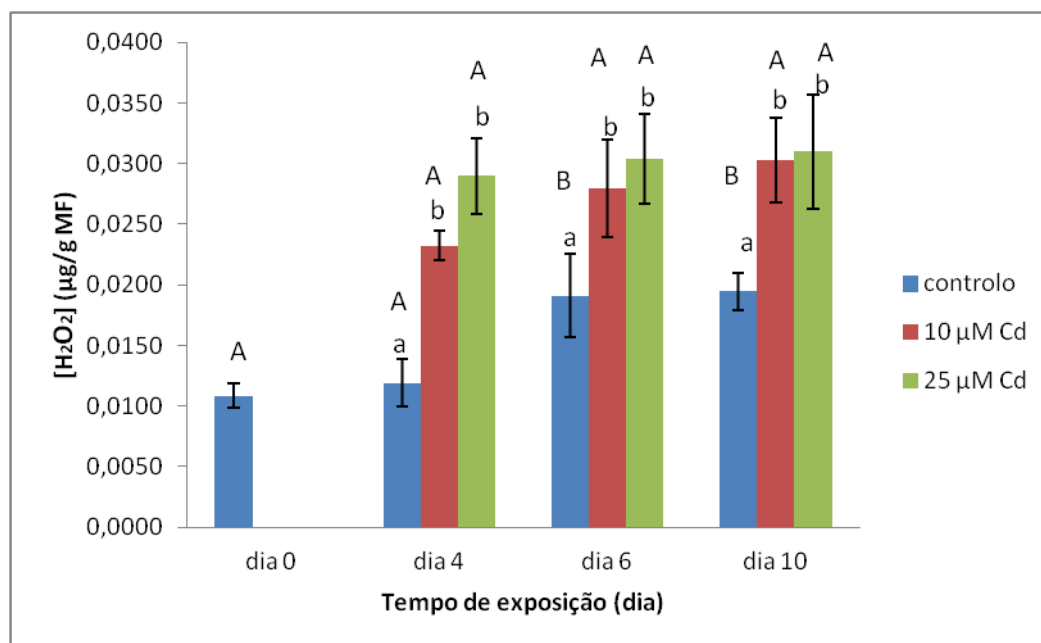
10 dias de exposição a 25 μM de Cd. Apesar dessa aparente variação entre concentrações de MDA nas raízes, observa-se através do tratamento estatístico apresentado na figura 22 (b), que nas raízes estas variações não foram significativas.

Sendo o teor de MDA formado um parâmetro indicativo de peroxidação lipídica e portanto de stress oxidativo na planta, verifica-se aparentemente que as folhas sofreram maior peroxidação lipídica induzida pelo cádmio do que as raízes onde esse efeito não foi detectado.

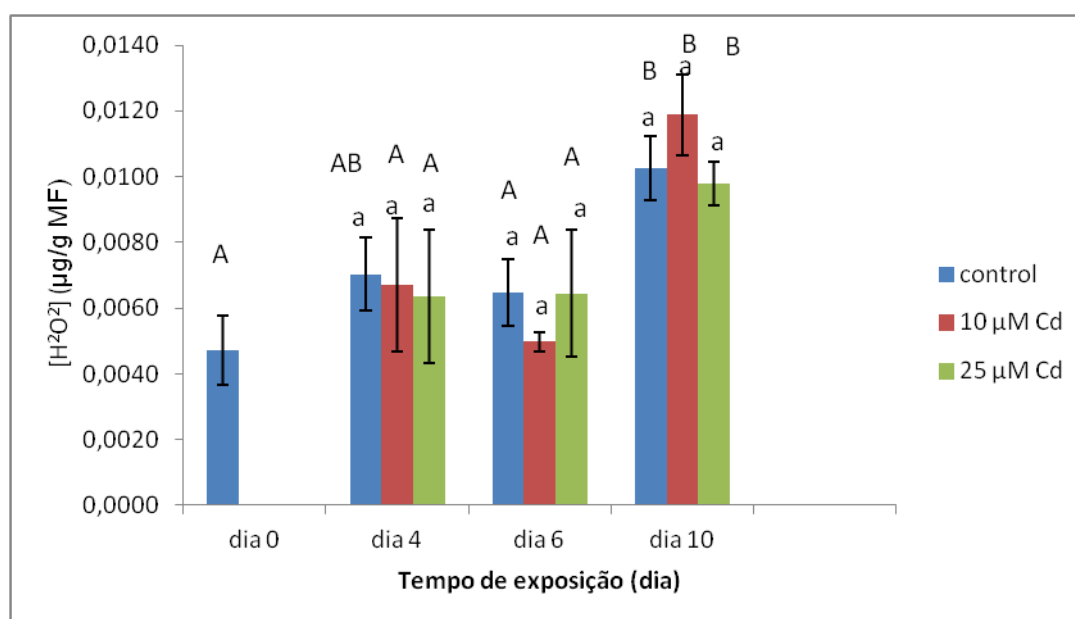
A peroxidação lipídica ocorrida pode ser resultante do aumento na produção de ROS devido ao efeito tóxico provocado pelo cádmio. Os radicais hidroxil derivados do peróxido de hidrogénio podem ser os principais responsáveis pela resposta de stress em plantas (Mittler 2002; Apel & Hirt, 2004).

4.1.4. Efeito do cádmio na produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2)

De seguida são apresentados os gráficos (Figura 23) que representam a variação do teor de peróxido de hidrogénio formado após exposição das nabiças ao cádmio.



(a)



(b)

Figura 23. Teor médio de peróxido de hidrogénio formado nas folhas (a) e raízes (b), após exposição das nabiças ao cádmio em hidroponia.

O teor de peróxido de hidrogénio nas folhas expostas ao cádmio não apresenta alterações significativas ao longo do tempo estudado. No entanto, apresenta diferenças significativas entre o controlo e os ensaios contaminados, indicando que o cádmio influencia o aumento da produção de H₂O₂ nas folhas.

Estes resultados mostram que a presença de Cd, mesmo na concentração mais baixa de 10 μM induz a formação de maiores quantidades de peróxido de hidrogénio nas folhas, em comparação com o controlo. Isto significa que de facto o cádmio induz a produção de ROS, uma resposta que é frequentemente descrita em relação à toxicidade do cádmio em diversas plantas (Markovska et al, 2009, Wang et al 2008).

Nas raízes como se pode observar na figura 23 (b), o teor de peróxido de hidrogénio formado aumenta após 10 dias de exposição ao cádmio para todas as concentrações utilizadas. Comparando as concentrações de cádmio utilizadas, verifica-se a inexistência de variações significativas entre os teores de H_2O_2 formados nas raízes.

De uma forma geral, o efeito do Cd na indução de ROS é aparentemente mais intenso nas folhas do que nas raízes.

4.1.5. Efeitos do cádmio na clorofila

4.1.5.1. Quantificação da clorofila - Valores Hansatech

As médias dos valores de leitura do medidor de clorofila Hansatech estão apresentadas no gráfico a seguir (Figura 24).

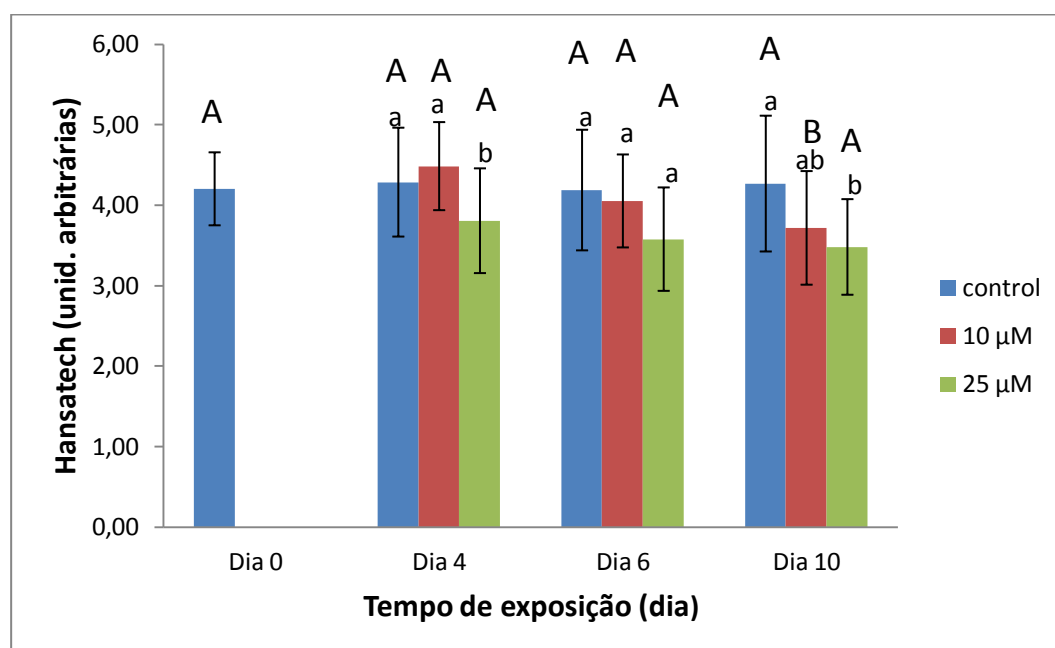


Figura 24. Teor médio de clorofila expresso em unidades arbitrárias – Ensaio em hidroponia.

O teor de clorofila expresso pelos valores de leitura do Hansatech apresentaram uma redução significativa após 10 dias de exposição ao cádmio com concentração de 10 μM . No

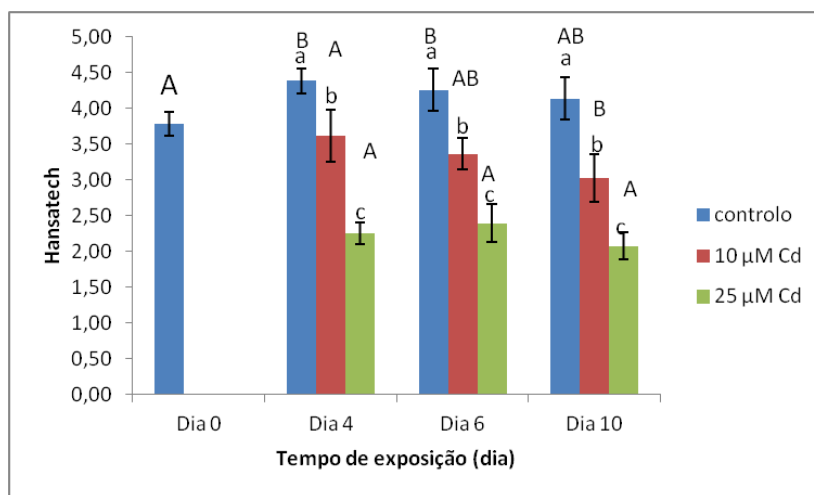
entanto, com a concentração de 25 μM de Cd não foram observadas diferenças significativas ao longo do tempo.

No dia 4 há uma redução significativa entre as concentrações 10 e 25 μM de Cd e no dia 10 a redução também é significativa entre o controlo e a concentração de 25 μM . No dia 6 não se observaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações.

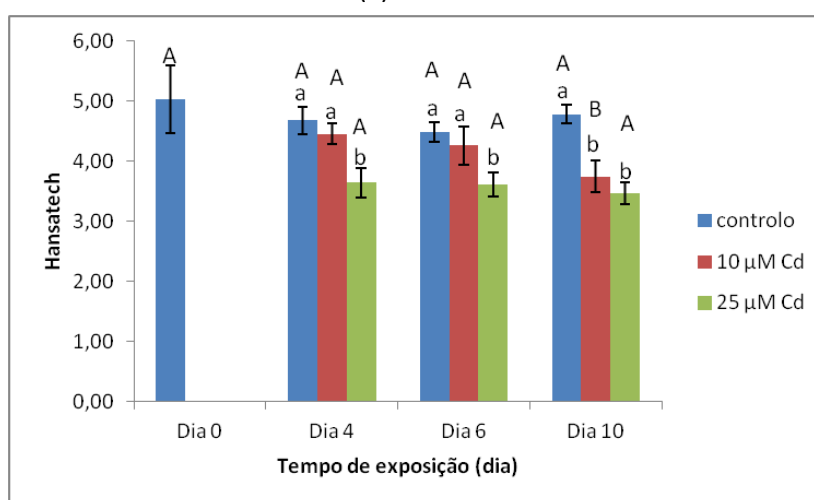
A diminuição observada nos teores de clorofila demonstram que o cádmio influenciou negativamente o nível de clorofila o que pode levar a outros efeitos prejudiciais para a planta. A clorofila e o sistema fotossintético no geral são bastante susceptíveis ao stress oxidativo induzido por cádmio. Este efeito já tem sido descrito como resultado da toxicidade de cádmio em outras plantas como o tabaco (Martins et al, 2011) ou o milho (Ekmekci & Ayhan, 2008).

4.1.5.2. Quantificação da clorofila de diferentes folhas da mesma planta – Valores Hansatech

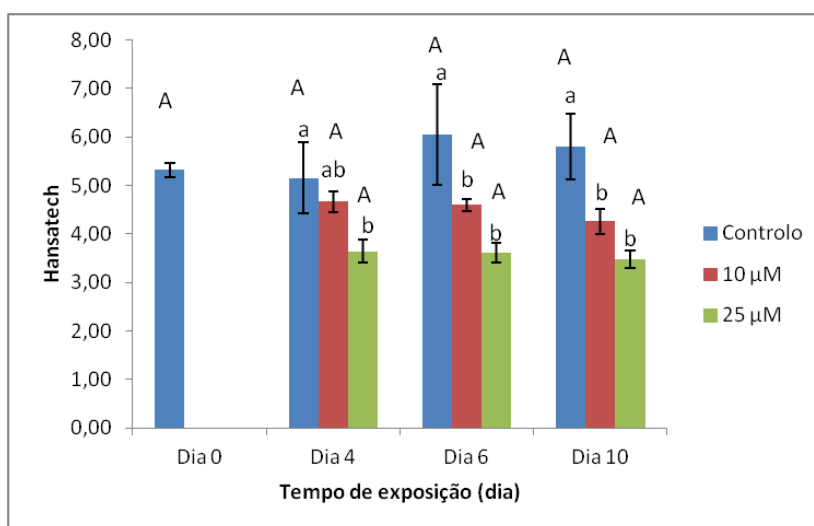
A seguir são apresentados os gráficos (Figura 25) com as médias da leitura Hansatech em 3 folhas da mesma planta. Pretendeu-se desta forma verificar as diferenças nos teores de clorofila de diferentes folhas mas de uma mesma planta.



(a) Folha 1



(b) Folha 2



(c) Folha 3

Figura 25. Teor médio de clorofila expresso em unidades arbitrárias, para três folhas de uma planta escolhida aleatoriamente – Ensaio em hidroponia.

Na figura 25 (a), ao comparar tempos diferentes e concentrações iguais nota-se uma redução significativa entre o dia 4 e o dia 10 para as concentrações de 10 μM , não havendo diferenças significativas ao longo do tempo para concentrações de 25 μM .

Quanto a quantificação da clorofila da folha 2 medida pelo Hansatech, observa-se uma redução significativa após 10 dias de exposição ao cádmio para a concentração de 10 μM .

Na figura 25 (c), observa-se que não existem diferenças significativas entre os valores Hansatech medidos na folha 3 ao longo do tempo estudado quando as concentrações de cádmio foram iguais.

De um modo geral, observa-se na figura 25 que com o aumento da concentração de cádmio para 25 μM , houve uma redução significativa na leitura dos valores hansatech em todas as 3 folhas avaliadas.

Comparando os valores das três folhas, é possível verificar a enorme variabilidade da planta, que mesmo antes de ser contaminada já apresentava valores diferentes, folha 1 (3,78), folha 2 (5,03) e folha 3 (5,32).

O objectivo em comparar o teor de clorofila nas 3 folhas de uma mesma planta, foi avaliar a variabilidade existente nessa planta, contudo para se obter uma conclusão significativa quanto a essa variabilidade seria preciso repetir essa comparação em mais plantas.

4.1.5.3. Quantificação da clorofila – Método espectrofotométrico

As médias do teor em clorofila determinadas pelo espectrofotómetro estão apresentadas na figura 26.

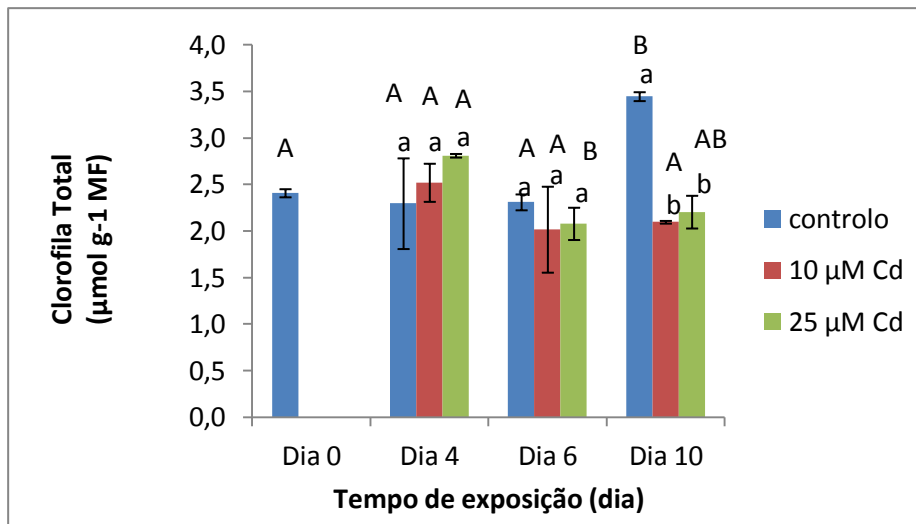


Figura 26. Teor da Clorofila total em folhas de nabiça (determinado pelo método espectrofotométrico de Sims & Gamon, 2002) – Ensaio em hidroponia.

Como era expectável na figura 26, observa-se um aumento significativo do teor da clorofila total nas plantas do controlo (sem cádmio) após 10 dias comparadas às plantas controlo dos dias anteriores. Nas plantas a 10 µM de Cd não há diferenças que sejam significativas ao longo do tempo estudado e nas plantas expostas à concentração de 25 µM de Cd, observa-se uma redução significativa do teor da clorofila total entre as plantas dos dia 4 e 6, não havendo diferenças significativas após o décimo dia e os dias anteriores. O facto de haver diferenças significativas no sexto dia de exposição a 25 µM de cádmio e não haver no décimo dia, pode ser explicado por se tratar de amostras heterogéneas, apesar de terem sido desenvolvidas em condições semelhantes antes da contaminação. Em plantas com a mesma concentração de cádmio eram nítidas as diferenças de tonalidades.

Analisando dias iguais e concentrações diferentes observa-se nos dias 4 e 6 que não há diferenças que sejam significativas com o aumento da concentração de cádmio nesses dias estudados. No dia 10, as plantas controlo (sem cádmio) apresentavam um teor em clorofila total muito superior às plantas contaminadas (10 e 25 µM). O teor de clorofila total diminuiu com o aumento da concentração de cádmio, o que pode ser explicado pela redução do teor em ferro verificada na figura 16.

Comparando-se os gráficos clorofila total e Valores Hansatech (Figuras 26 e 24), observa-se que os valores Hansatech diminuíram com o aumento da concentração de cádmio para 25 µM, o que não foi verificado no gráfico da clorofila total que demonstrou uma tendência em aumentar no dia 4 e só diminuiu no último dia estudado.

A explicação para esse comportamento do teor em clorofila total, pode estar no facto de que o método espectrofotométrico embora forneça resultados objectivos, pode ser penalizado pela amostragem mais reduzida, pois trata-se de um método destrutivo. Já os valores Hansatech podem ser mais representativos por serem obtidos por uma quantidade maior de plantas uma vez que a leitura efectuada pelo aparelho não danifica a planta.

4.1.5.4. Conversão dos valores Hansatech em Teor de clorofila

Com os valores de Hansatech e os teores de clorofila total obtidos pelo método espectrofotométrico, construiu-se uma curva de calibração (Figura 27). Os teores de clorofila representam a variável dependente (y) e os valores de Hansatech a variável independente (x).

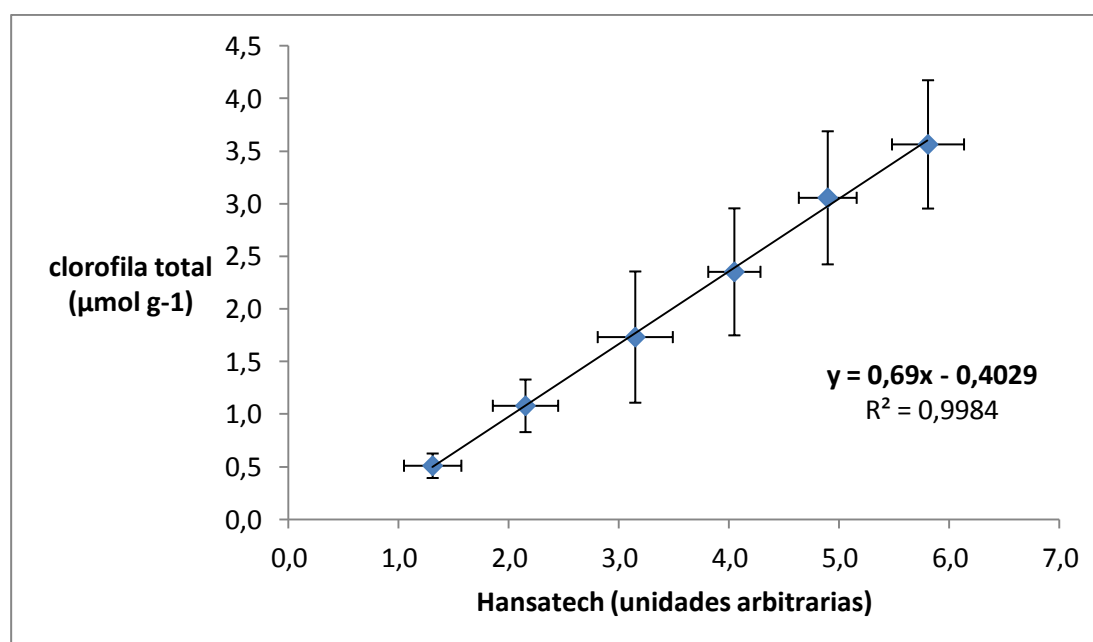


Figura 27. Curva padrão que correlaciona os valores da leitura do Hansatech com o teor de clorofila total obtido pelo método espectrofotométrico.

Através da figura 27 é possível verificar a linearidade da relação valores Hansatech e teor de clorofila e calcular um factor de conversão de valores de Hansatech em teor de clorofila.

4.1.6. Carotenóides

Os teores de carotenóides calculados segundo o método de Sims & Gamon, (2002), estão apresentados na figura 28.

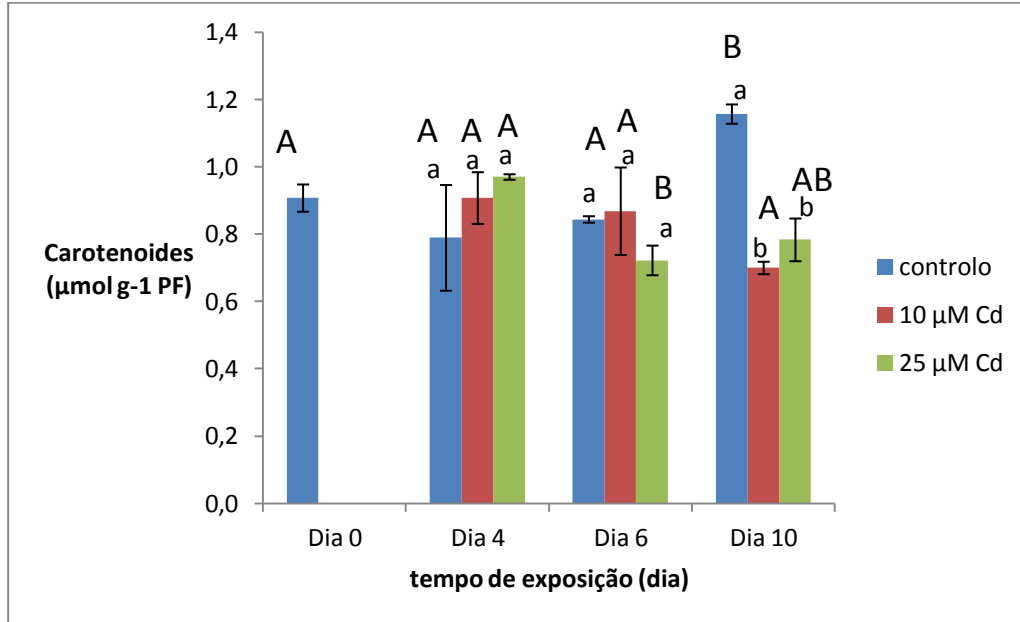


Figura 28. Teor médio de carotenóides – Ensaio em hidroponia.

Na figura 28, observa-se no décimo dia que o teor de carotenóides aumentou significativamente nas plantas controlo (sem cádmio) comparado aos dias anteriores e às demais concentrações. As alterações não foram significativas ao longo do tempo em plantas expostas a 10 μM, ocorrendo diferenças significativas entre os dias 4 e 6 expostos a 25 μM de cádmio.

Ao décimo dia, observa-se que as plantas que cresceram em solução contaminada com cádmio sofreram um decréscimo no teor de carotenóides, o que está de acordo com a redução previamente observada do teor de clorofila.

4.1.7. Carotenóides / clorofila

Os valores da relação da razão carotenóides/clorofila, estão apresentados na figura 29.

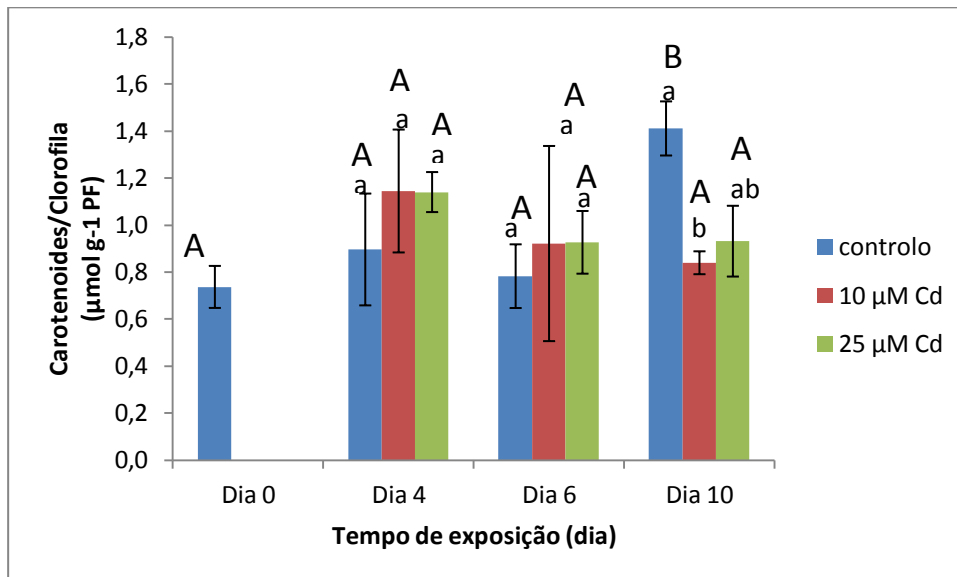


Figura 29. Razão carotenóides/clorofila total nas folhas das nabiças – Ensaio em hidroponia.

Os maiores valores da razão carotenóides/clorofila foram encontrados nas plantas controle (sem cádmio) do dia 10, plantas que apresentaram diferenças significativas nesse mesmo dia comparadas às plantas expostas a 10 µM e não apresentando diferenças significativas em relação às plantas expostas a 25 µM. No 10º dia observou-se uma diminuição desta razão para as plantas que cresceram em solução contaminada com cádmio. Essa diminuição pode ser considerada como um biomarcador de stress gerado pelo cádmio, pois sob condições de stress oxidativo, as plantas aumentam suas concentrações de carotenóides como medida para combater a formação de ROS (Pernia et al., 2008).

Martins et al, (2011) observaram em plantas de tabaco contaminadas com Cd, uma diminuição desta razão, pelo que esta resposta pode variar em função do tipo de planta e da duração da contaminação.

4.2. Resultados do ensaio em turfas

4.2.1. Análise dos elementos minerais – Ensaio em turfas

Os elementos minerais analisados no ensaio da rega em turfas, foram os mesmos do ensaio em hidroponia (Cd, Na, K, Ca, Mg, Zn, Mn, Fe e Cu). Semelhantemente ao que ocorreu na hidroponia, não foi detectada nas plantas da rega a presença de cobre.

A seguir, são apresentados os gráficos (Figuras 30 a 38) com as concentrações dos minerais analisados nas plantas da rega.

Em todos estes gráficos foi comparada a influência do cádmio em relação a concentração destes outros minerais presentes nas plantas de nabiça.

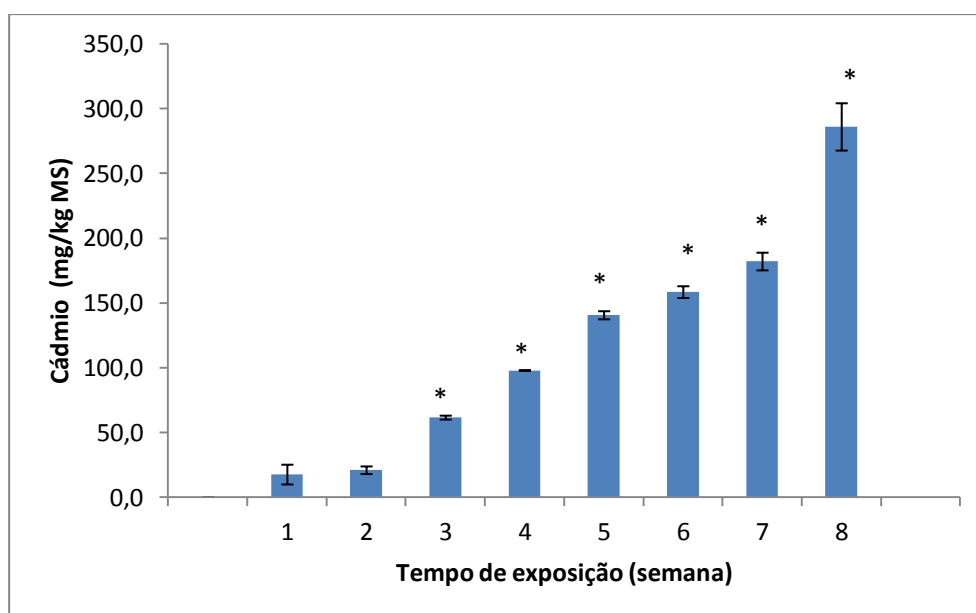


Figura 30. Teor de cádmio nas folhas – Rega com solução contaminada com 10 μ M de Cd em turfas. Os asteriscos indicam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cada uma das semanas com a semana 0.

Na figura 30, observa-se que a concentração de cádmio nas folhas das plantas contaminadas em turfas, aumentou a partir da 3ª semana de exposição. Este comportamento é expectável, visto que quanto mais tempo as plantas estiverem em contacto com a turfa contaminada maior a quantidade de Cd absorvido. Provavelmente ao fim da 8ª/9ª semana atinge-se um limite de Cd absorvido.

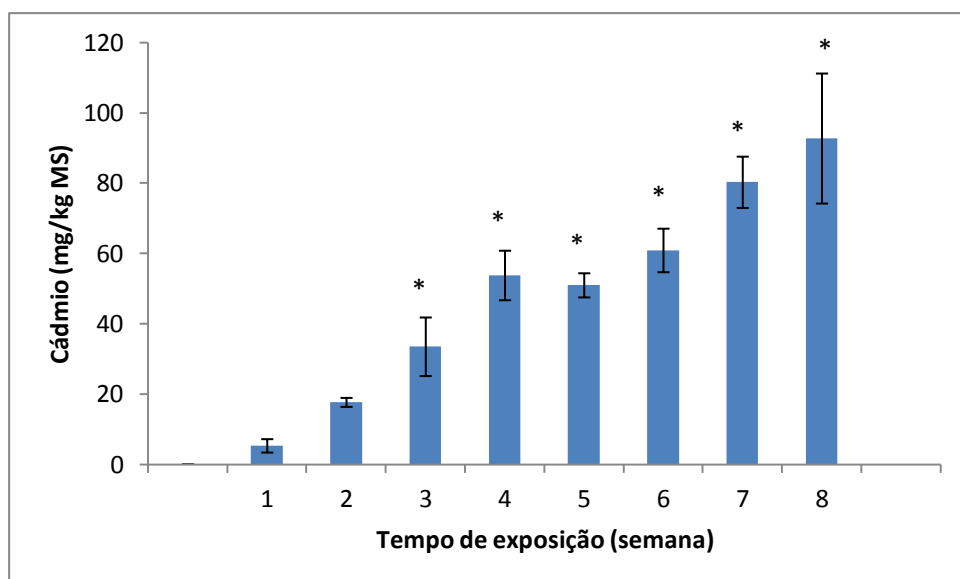


Figura 31. Teor de cádmio nas turfas – Rega com solução contaminada com 10 μ M de Cd em turfas.

Na figura 31, observa-se que a concentração de cádmio presente nas turfas contaminadas, aumentou ao longo do tempo de exposição, como seria de esperar visto estar-se a regar a turfa com a solução contaminada.

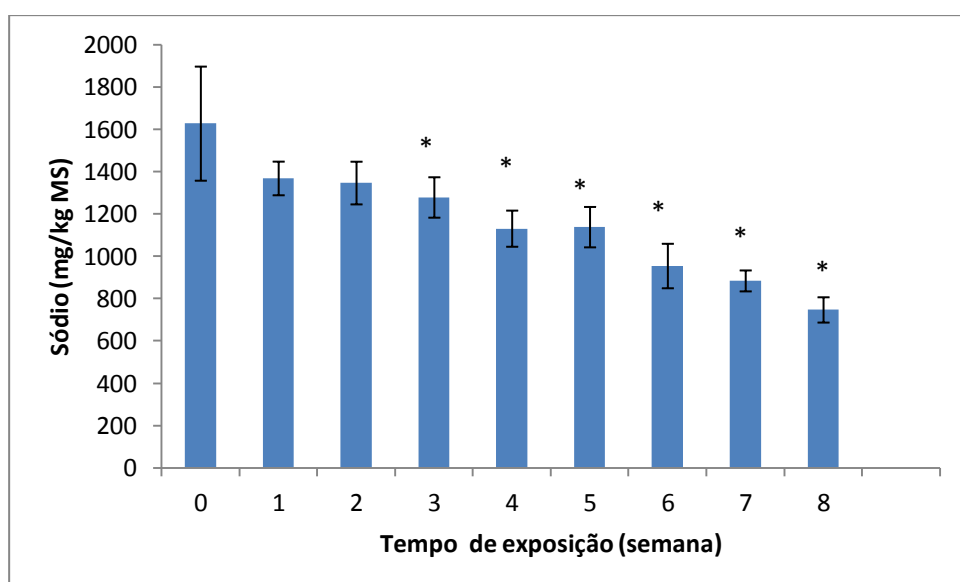


Figura 32. Teor de sódio nas folhas - Rega com solução contaminada com 10 μ M de Cd em turfas.

Na figura 32, observa-se que a concentração de sódio nas folhas diminuiu significativamente após a 3ª semana de exposição ao cádmio na rega. Não sendo verificadas variações

significativas no teor de sódio entre a semana 0 (antes de iniciar a contaminação) e as semanas 1 e 2, comportamento semelhante ao que ocorreu no ensaio em hidroponia até o 10º dia de estudo.

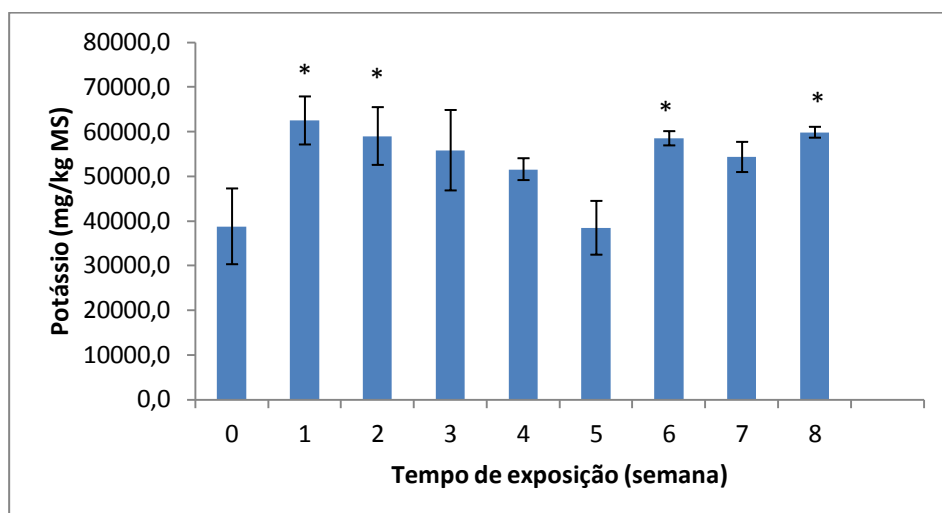


Figura 33. Teor de potássio nas folhas - Rega com solução contaminada com 10 µM de Cd em turfas.

O teor de potássio nas folhas do ensaio em turfas apresentou oscilações nas plantas contaminadas ao longo do tempo. Nas semanas 1, 2, 6 e 8 observa-se um aumento significativo em comparação com a semana 0 (antes de iniciar a contaminação).

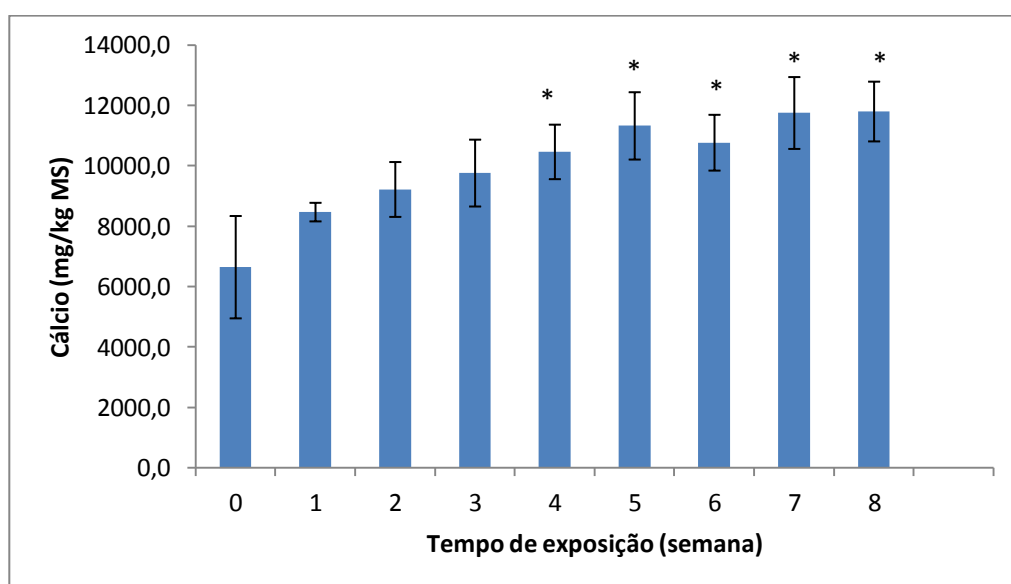


Figura 34. Teor de cálcio nas folhas - Rega com solução contaminada com 10 µM de Cd em turfas.

Na figura 34, observa-se que a concentração de cálcio nas folhas foi afectada significativamente pelo cádmio ao longo do tempo de exposição a partir da 4ª semana.

Nas primeiras semanas do ensaio em turfas não se verificam diferenças significativas quanto ao teor de cálcio comparadas à semana 0 (antes de iniciar a contaminação), semelhante ao verificado no ensaio em hidroponia (Figura 12).

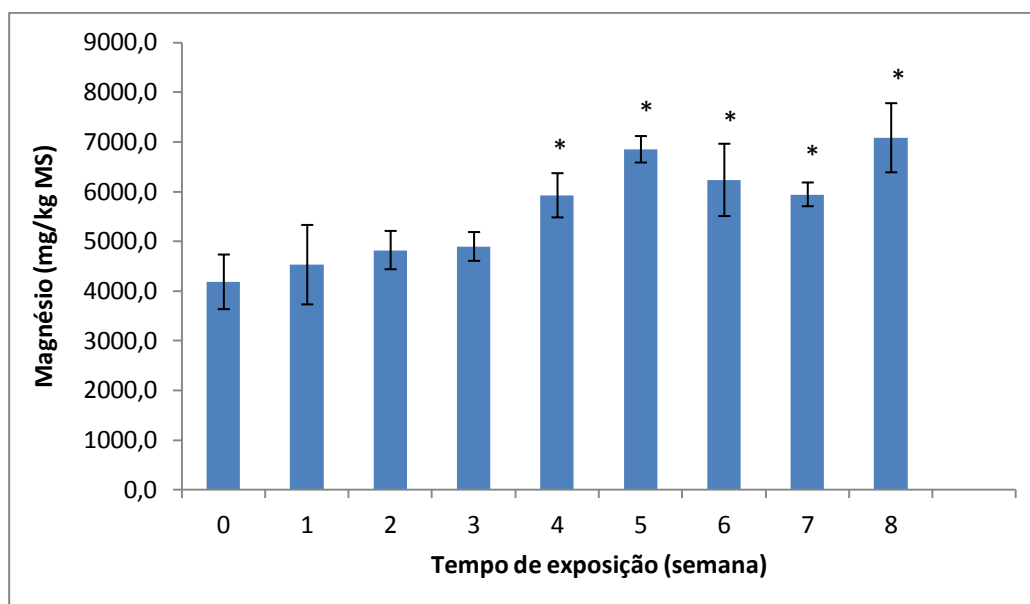


Figura 35. Teor de magnésio nas folhas - Rega com solução contaminada com 10 µM de Cd em turfas.

Na figura 35, foram verificadas diferenças significativas nas concentrações de magnésio em relação à semana 0 (antes de iniciar a contaminação) apenas após a 4ª semana em que o cádmio foi aplicado na rega das turfas.

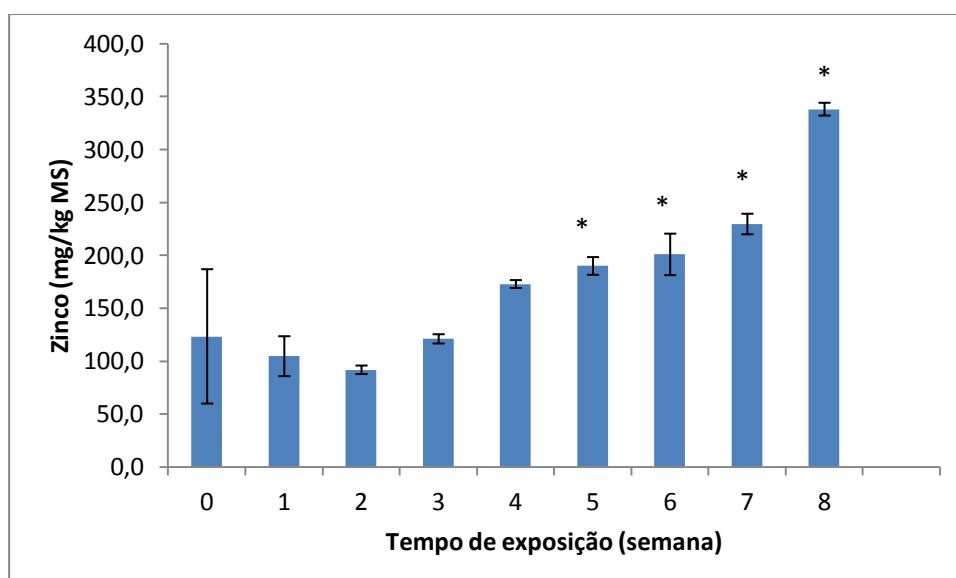


Figura 36. Teor de zinco nas folhas - Rega com solução contaminada com 10 µM de Cd em turfas.

Na figura 36, observa-se que o teor de zinco nas folhas foi afectado pelo cádmio após a 5ª semana de exposição comparado ao teor medido na semana 0 (antes de iniciar a contaminação).

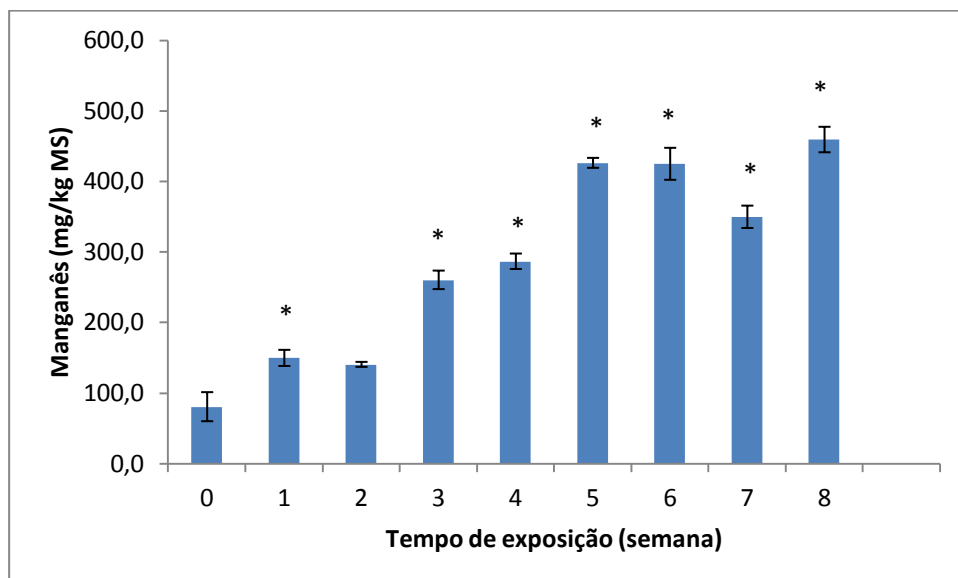


Figura 37. Teor de manganês nas folhas - Rega com solução contaminada com 10 µM de Cd em turfas.

Na figura 37, observa-se que o cádmio influenciou significativamente na concentração de manganês em todas as semanas, excepto na 2ª semana onde não se verifica variações em relação à semana 0 (antes de iniciar a contaminação).

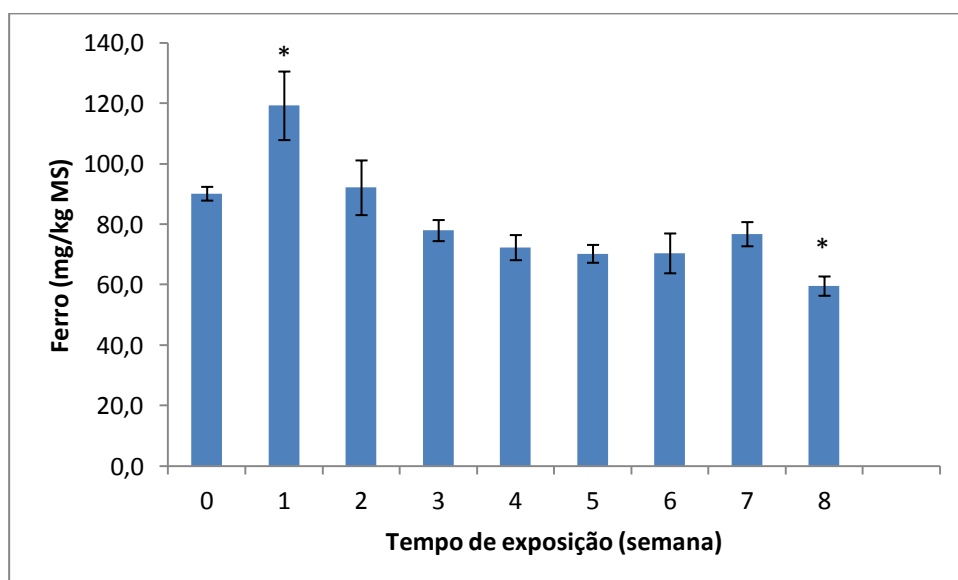


Figura 38. Teor de ferro nas folhas - Rega com solução contaminada com 10 µM de Cd em turfas.

Na figura 38, observa-se que a concentração de ferro nas folhas aumentou significativamente após a 1ª semana de exposição ao cádmio, sendo reduzido a partir das semanas seguintes. Na 8ª semana observa-se que o teor de ferro diminuiu significativamente em relação a semana 0 (antes de iniciar a contaminação), podendo indicar que após esse tempo de exposição o sistema de absorção do ferro permitiu a entrada do cádmio na planta, conforme se verifica na figura 30, onde os valores de cádmio são os maiores. Esta diminuição pode também ser responsável pelo aparecimento de clorose nas folhas.

Nestes ensaios não houve possibilidade de fazer a comparação dos teores dos elementos minerais em plantas a crescer nas mesmas condições mas sem contaminação com Cd, pelo que não se poderão tirar grandes conclusões sobre a variação destes elementos em função do teor de Cd na planta.

4.2.2. Efeitos do cádmio na clorofila

4.2.2.1. Quantificação da clorofila do ensaio em turfas – Valores Hansatech

A seguir são apresentados os valores da leitura Hansatech nas folhas das nabijas do ensaio da rega em turfas (Figura 39).

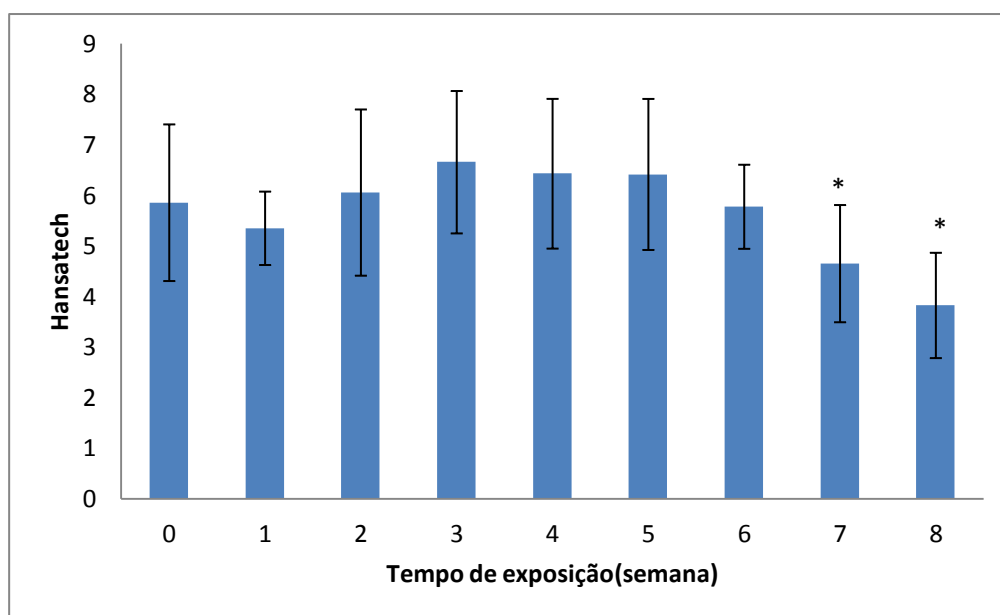


Figura 39. Teor médio de clorofila expresso em unidades arbitrárias – Rega com solução contaminada com 10 μM de Cd em turfas.

Os valores da leitura Hansatech apresentados na figura 39, indicam que só existem diferenças significativas nos valores Hansatech entre as plantas da semana 0 (antes de iniciar a contaminação) e as plantas expostas ao cádmio (10 μM) a partir da 7ª semana, nessa altura as plantas já estavam com as folhas mais amareladas e murchas. Estes resultados estão de acordo com os observados em solução nutritiva e confirmam que a acumulação de cádmio com o tempo (observada no gráfico 30) induz alterações no sistema fotossintético das plantas, diminuindo o teor de clorofila.

4.2.2.2. Clorofila calculada – Valores Hansatech convertidos em teor de clorofila

Os valores da clorofila calculada do ensaio da rega em turfas (Figura 40), foram obtidos com base na curva padrão apresentada na figura 27.

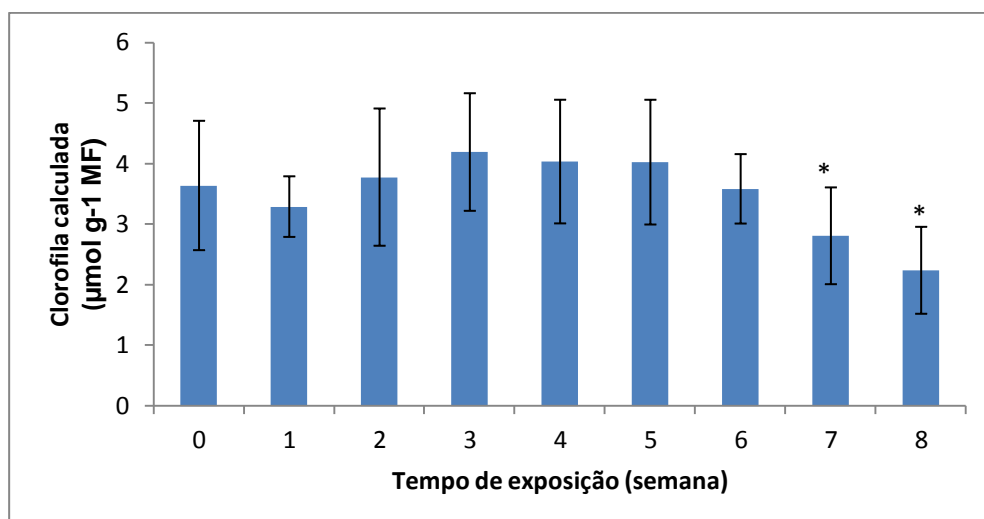


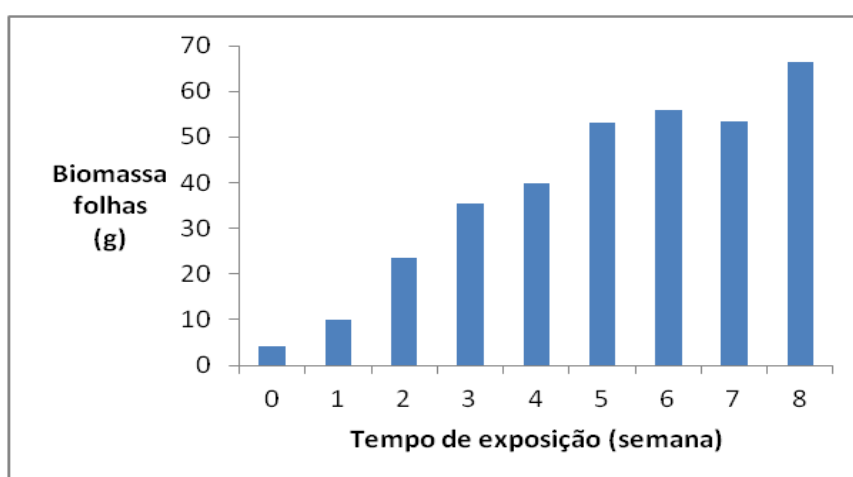
Figura 40. Quantificação da clorofila calculada - Rega com solução contaminada com 10 µM de Cd em turfas.

Na figura 40, são apresentados todos os valores da leitura do aparelho Hansatech convertidos em teor em clorofila, que confirma os resultados apresentados na figura 39.

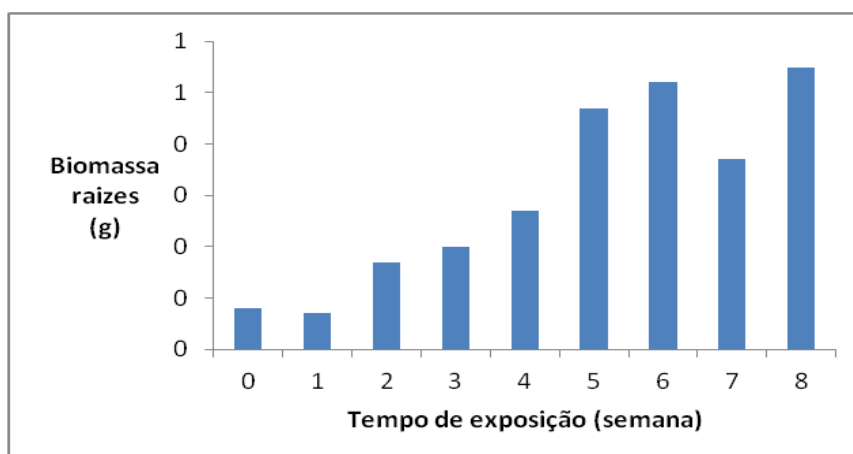
4.2.3. Efeitos do cádmio nos aspectos fisiológicos – Ensaio da rega em turfas

4.2.3.1. Biomassa das folhas e raízes do ensaio da rega em turfas

A seguir são apresentados os gráficos (Figura 41) com os valores da biomassa das folhas e das raízes antes de serem armazenadas na estufa para a secagem.



(a)



(b)

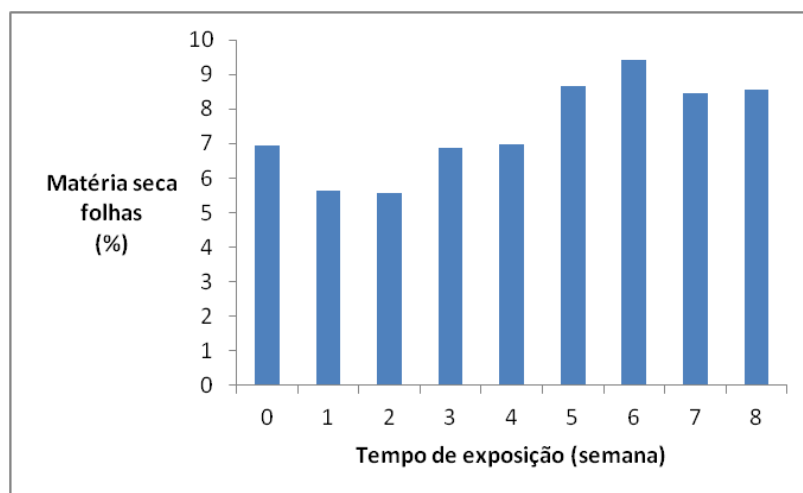
Figura 41. Biomassa das folhas (a) e raízes (b) - Rega com solução contaminada com 10 μM de Cd em turfas.

Na figura 41 (a), observa-se de uma forma geral que a quantidade de biomassa das folhas aumentou ao longo do tempo, indicando que as folhas das plantas em turfas não foram afectadas por concentrações de 10 μM de Cd. Resultados semelhantes estão apresentados no ensaio em hidroponia (Figura 17).

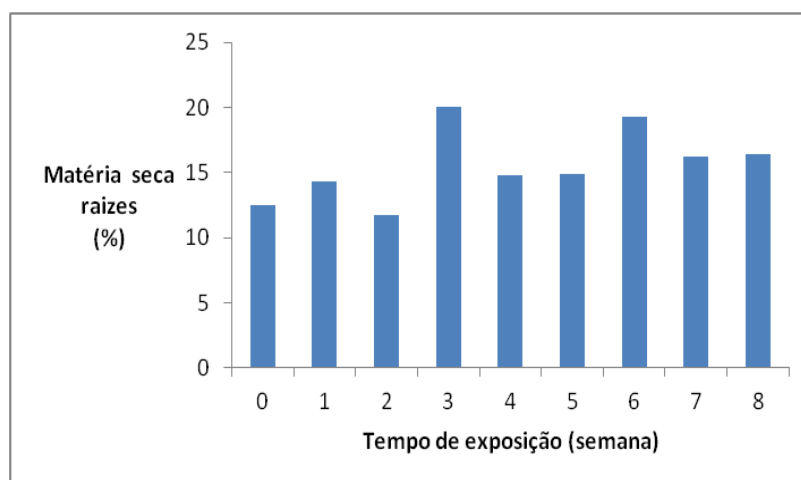
Na figura 41, observa-se que a biomassa das raízes apresentou uma resposta semelhante à biomassa das folhas no que se refere ao acréscimo que teve ao longo do tempo. No entanto na 7ª semana diminuiu nitidamente em relação às semanas anteriores e em relação à 8ª semana. Essa nítida redução pode ser devida às diferenças de tamanho das plantas expostas ao mesmo tempo e concentração de cádmio.

4.2.3.2. Teor de matéria seca das folhas e raízes do ensaio da rega em turfas

Os valores do teor de matéria seca das folhas e raízes do ensaio da rega em turfas, estão apresentados na figura 42.



(a)



(b)

Figura 42. Teor de matéria seca das folhas (a) e raízes (b) em percentagem - Rega com solução contaminada com 10 μ M de Cd em turfas.

Pela análise da figura 42 (a), observa-se uma oscilação na percentagem da matéria seca das folhas. Nas duas primeiras semanas após a contaminação, a percentagem da matéria seca diminui o que pode indicar que inicialmente o cádmio não afectou a absorção de água pela planta. No entanto a partir da 5ª semana observa-se um aumento dessa percentagem

que pode ser explicada pelo efeito da toxicidade do cádmio nas plantas que reduz à absorção de água pela planta (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Comparando-se os gráficos da percentagem da matéria seca das folhas e das raízes, observa-se que a massa seca das raízes em percentagem foi superior à massa seca das folhas.

4.2.3.3. Número de folhas – Ensaio em turfas

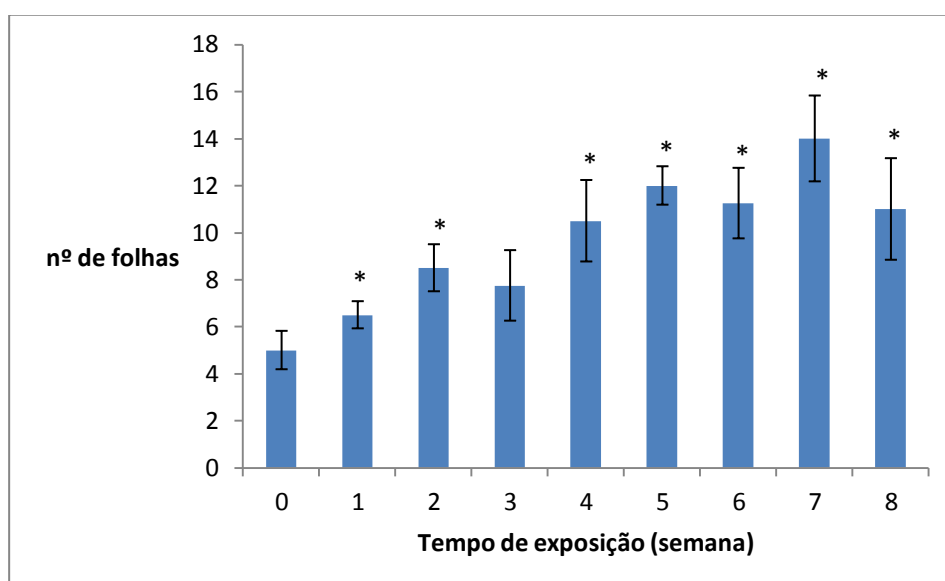


Figura 43. Número médio de folhas por planta - Rega com solução contaminada com 10 µM de Cd em turfas.

Na figura 43, observa-se um aumento significativo do número de folhas ao longo do tempo em todas as semanas, excepto na semana 3. Esse aumento já era esperado pelo facto da planta estar em plena fase de desenvolvimento, no entanto para se afirmar se o cádmio afectou no crescimento das folhas seria necessário ter plantas controlo (sem cádmio) em todas as semanas estudadas.

4.3. Comparação entre o ensaio em hidroponia e o ensaio em turfas

A seguir é apresentado o quadro comparativo (Quadro 5) entre os resultados do ensaio em hidroponia e o ensaio em turfas.

Quadro 5. Comparação entre o ensaio em hidroponia e o ensaio em turfas.

ENSAIO EM HIDROPONIA					ENSAIO EM TURFAS				
Tempo de exposição	Dia0	Dia 4	Dia 6	Dia 10	Tempo de exposição	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
						Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
	Controlo	[Cd] =10 µM	[Cd] =10 µM	[Cd] =10 µM		Controlo	Rega com solução contaminada com 10µM de Cd em turfas		
[Cd] nas folhas (mg/kg MS)	0	46,8	57,6	130,5	[Cd] nas folhas (mg/kg MS)	0	17,7	21	61,6
					[Cd] nas turfas (mg/kg MS)	0	5,3	17,7	33,5
[Na] nas folhas (mg/kg MS)	521,4	541,0	397,5	469,7	[Na] nas folhas (mg/kg MS)	1627,2	1368,3	1346,5	1278,4
[K] nas folhas (mg/kg MS)	65402,3	74775,0	80537,3	63921,9	[K] nas folhas (mg/kg MS)	38764,1	62475,7	58994,9	55811,7
[Ca] nas folhas (mg/kg MS)	9455,2	8647,4	9211,1	10662,8	[Ca] nas folhas (mg/kg MS)	6649,0	8473,0	9222,7	9765,2
[Mg] nas folhas (mg/kg MS)	5689,8	5545,4	5158,5	5952,8	[Mg] nas folhas (mg/kg MS)	4182,7	4528,1	4821,6	4894,9
[Zn] nas folhas (mg/kg MS)	622,0	572,2	489,9	575,5	[Zn] nas folhas (mg/kg MS)	123,3	104,6	91,7	121,0

[Mn] nas folhas (mg/kg MS)	662,7	602,6	619,7	584,3	[Mn] nas folhas (mg/kg MS)	80,4	149,6	140,4	260,3
[Fe] nas folhas (mg/kg MS)	88,2	76,1	67,0	89,0	[Fe] nas folhas (mg/kg MS)	90,1	119,2	92,1	77,9
Média Hansatech folhas	4,20	4,48	4,05	3,72	Média Hansatech folhas	5,85	5,35	6,06	6,66
Clorofila calculada ($\mu\text{mol/g MF}$)	2,496	2,690	2,392	2,161	Clorofila calculada ($\mu\text{mol/g MF}$)	3,637	3,288	3,775	4,190
nº de folhas por planta	6,50	6,25	5,75	8,00	nº de folhas por planta	5,000	6,500	8,500	7,750
Biomassa folhas (g)	3,02	2,70	2,42	4,26	Biomassa folhas (g)	4,18	9,92	23,40	35,47
Peso seco folhas (%)	6,882	5,473	5,694	7,218	Peso seco folhas (%)	6,94	5,65	5,56	6,88

Avaliando os resultados obtidos (Quadro 5) nos ensaios (hidroponia e turfa) a 10 μM , verifica-se que em tempos de exposição aproximados, o ensaio em hidroponia apresenta concentrações de cádmio superiores às concentrações avaliadas nas plantas em turfas.

No 6º dia do ensaio em hidroponia as folhas apresentam concentrações de Cd de 57,6 mg/kg MS, valor muito superior às 17,7 mg/kg % MS obtidas no ensaio em turfas (7º dia).

As concentrações de cádmio são superiores nas folhas do ensaio em hidroponia porque o Cd está mais disponível em solução nutritiva do que em turfas, uma vez que as turfas também absorvem uma parte significativa do Cd, o que pode ser verificado pelos resultados (Quadro 5). Ao 7º dia a concentração de cádmio nas turfas foi de 53 mg/kg % MS enquanto as folhas nesse mesmo tempo apresentaram concentrações de 17,7 mg/kg % MS.

Os teores de Cd detectados em todos os ensaios contaminados com 10 μM de Cd ultrapassam em muito o valor previsto na legislação portuguesa. O que pode representar uma situação grave para a saúde pública, caso plantas com estes teores de cádmio fossem consumidas, uma vez que as plantas mesmo com altos teores de Cd não apresentam alterações visíveis que possam induzir à rejeição pelos consumidores.

No que se refere aos elementos minerais, observa-se no Quadro 5, que para tempos aproximadamente iguais, os teores dos minerais Na e Fe são superiores no ensaio em turfas, indicando que o efeito da toxicidade do Cd sobre estes nutrientes pode ter sido minimizado pela interacção com outros elementos presentes na turfa.

A clorofila determinada pelo aparelho Hansatech e a clorofila calculada foram superiores no ensaio em turfas comparadas aos valores obtidos no ensaio em hidroponia. Como já foi mencionado no ponto 4.1.8. “Efeitos do cádmio na clorofila”, o cádmio pode induzir alterações no sistema fotossintético das plantas, diminuindo o teor de clorofila.

A biomassa das folhas do ensaio em turfas é superior à biomassa das folhas do ensaio em hidroponia. As percentagens do peso seco nos dois ensaios, apresentam uma tendência em diminuir até o 7º dia de exposição ao Cd. Essa diminuição pode indicar que até uma semana de exposição o Cd não afecta a absorção da água em nenhum dos ensaios estudados.

5. CONCLUSÕES

Os teores de cádmio detectados nas folhas de nabiça do ensaio em hidroponia a 10 μM de Cd foram superiores aos teores detectados nas plantas em turfas contaminadas com essa mesma concentração. As concentrações de Cd maiores verificadas no ensaio em hidroponia podem ser devidas ao facto do Cd estar mais disponível em solução nutritiva do que em turfas, uma vez que as turfas também absorvem uma parte significativa do Cd.

Ao aumentar a concentração de cádmio do ensaio em hidroponia de 10 μM para 25 μM , observou-se que aspectos como a cor e o tamanho das folhas não foram alterados em todas as plantas.

A *B. rapa* acumulou mais de 200 mg/kg de cádmio em suas folhas, comprovando a sua elevada capacidade de absorver e transportar Cd para a parte aérea das plantas como fazem as espécies hiperacumuladoras.

Os resultados obtidos indicaram que a adição de cádmio influenciou significativamente as concentrações de Na, K, Zn e Fe detectadas nas folhas do ensaio em hidroponia. As plantas expostas a maiores concentrações de Cádmio (25 μM) apresentaram menores concentrações de Zn, Fe e Na, podendo sugerir que houve competição na absorção ou transporte entre estes minerais e o Cd pelas plantas.

Os elementos Ca, Mg e Mn não foram afectados pelo Cd em nenhuma das concentrações utilizadas no ensaio em hidroponia.

Comparando as concentrações dos elementos Na e Fe obtidas nos dois ensaios realizados, verifica-se que as concentrações destes minerais foram mais elevadas nas plantas do ensaio em turfas do que nas plantas em solução nutritiva. O efeito da toxicidade do Cd sobre os minerais pode ter sido minimizado pela interacção com outros elementos presentes na turfa.

A percentagem do teor de matéria seca das folhas teve aumento aparente no ensaio em hidroponia, porque a quantidade de água absorvida diminuiu, indicando que o Cd pode ter afectado a capacidade de absorção de água pela planta.

Os resultados do ensaio em turfas sugerem que o Cd só afectou a absorção de água pela planta a partir da 5ª semana, o que foi observado pelo aumento da percentagem do teor de matéria seca nesse tempo.

As folhas do ensaio em hidroponia sofreram maior peroxidação lipídica induzida pelo cádmio do que as raízes.

Os resultados mostraram que o Cd, mesmo na concentração mais baixa (10 μM) induziu o aumento da formação de H_2O_2 nas folhas do ensaio em hidroponia. O efeito do Cd na indução de ROS demonstrou ser mais intenso nas folhas do que nas raízes.

O cádmio influenciou negativamente o nível de clorofila do ensaio em hidroponia, o que também se reflectiu no teor médio de carotenoides ao fim de 10 dias de exposição.

Para obter conclusões mais significativas no que se refere à influência do Cd nas nabiças, seria necessário repetir alguns ensaios realizados utilizando mais plantas para ter raízes em quantidades suficientes para as determinações dos elementos minerais e também para tentar minimizar a heterogeneidade das amostras. Também seria importante repetir o ensaio da turfa, fazendo com que plantas controlo (sem cádmio) cresçam ao mesmo tempo que as plantas contaminadas, para poder comparar com maior precisão as variações dos elementos minerais em função do teor de Cd nas plantas.

Ao avaliar o comportamento global das nabiças é de realçar que mesmo quando se verificam concentrações de Cd superiores às previstas por lei, as plantas não apresentam alterações visíveis que possam induzir a rejeição pelos consumidores. Dai a importância de controlar o local de cultivo, a qualidade da água utilizada na rega e a adição de nutrientes no solo, a fim de evitar contaminações do homem e outros animais por metais pesados como o cádmio.

Após a recepção de hortícolas como as nabiças nas indústrias alimentares (como matéria prima) ou no mercado (venda directa ao consumidor), não existem processos tecnológicos que possam reduzir o teor de Cd presentes nestas plantas. Por isso, é importante realizar vários estudos sobre o efeito do Cd em plantas como as nabiças devido à sua importância alimentar e económica.

6. BIBLIOGRAFIA

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 1999 em Toxicological Profile for cadmium por Department of Health and Human Services, USA.

Almeida, D. 2006. Brassicáceas. Manual de culturas hortícolas vol I, Editora Presença, Lisboa, Portugal, pp. 283 – 291.

Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) em Cádmio 2008, consultado a 10 de Maio de 2011 na World Wide Web: <http://www.ase.pt>

Baker, A.J.M., Brooks, R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. - Biorecovery 1:81-126.

Barazani, O., Dudai, N., Khadka, U. R., Golan-Goldhirsh, A. 2004. Cadmium accumulation in *Allium schoenoprasum* L. grown in an aqueous medium. Chemosphere, 57:1213-1218.

Biggs, T. 1980. Género Brassica. Culturas Hortícolas, Enciclopédia de práticas agrícolas. EUROAGRO, Publicações Europa-América, pp. 71 – 73.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany, 91: 179-194.

Calabrese, E. J., Blain, R. 2005. The occurrence of hermetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. Toxicology and Applied Pharmacology, Raleigh, 202: 289-301.

Cataldo D A, Garland T R, Wildung R E. 1983. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. Plant Physiol, 73: 844–848.

Chen, S.L.; Kao, C. H.1995. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium Plant Growth regulation, 16: 249-252.

Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie 88: 1707–1719

Cobbett, C. S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinio in Plant Biology*, 3: 211-216.

Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A. R., Munters, E., Artois, T. J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K. 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Springer*, 23: 927-940.

Demiral, T., Türkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53: 247-257.

Devi, S. R., Prasad, M. N. V. 2004. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: M. N. V. Prasad (2nd Ed), *Heavy Metal Stress in plants: From biomolecules to ecosystems*. Springer- Verlag. Heidelberg. Narosa New Delhi, pp. 127-145.

DI TOPPI, L. S., Gabbrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105–130.

Duffus, J. H., 2002, Heavy Metal, IUPAC, Pure Appl. Chem. 74 (5): 793-807.

Gajewska *et al.* 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum* 50 (4): 653-659.

Gallego, S. M., Benavides, M. P., Tomaro, M. L. 1996. Effects of heavy metal ions on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*. 121: 151-159.

Gardê, A., Gardê, N. 1988. Culturas hortícolas. Nova colecção técnica agrícola. Clássica Editora.

Gonçalves, J. F., Maldaner, J., Rossato, L. V., Tabaldi, L. A., Skrebsky, E. C., Farias, J. G., Bisognin, D. A., Nicoloso, F. T. 2009. Crescimento *in vitro* de plântulas de batata em diferentes doses de cádmio. *Ciência Rural. Santa Maria. Brasil*. 39 (9): 2625-2628.

Guimarães, M. A., Santana, T. A., Silva, E. V., Zenzen, I. L., Loureiro, M. E. 2008. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*. 3 (1): 58-68.

Greger, M. Bertell, G. 1992. Effects of Ca²⁺ and Cd²⁺ on the carbohydrate metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Journal of Experimental Botany*. 43 (247): 167-173.

Henry W. 1998. Dicionário de Ecologia e Ciências Ambientais. Art. Editor-Geral; Prefácio de F. Herbert Borlmann; tradução Mary Amazonas Leite de Barros. Título Original The Dictionary of Ecology and Environmental Science. São Paulo: Companhia Melhoramentos.

Hirata, K., Tsuji, N., Miyamoto, K. 2005. Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. Journal of Bioscience and Bioengineering. 100 (6): 593-599.

International Cadmium Association (ICdA) em Cadmium, Working towards a sustainable future, consultado a 03 de setembro de 2011 na Word Wide Web: <http://www.cadmium.org>

Jiang, X. J., Luo, Y. M., Liu, Q., Liu, S. L., Zhao, Q. G. 2003. Effects of cadmium on nutrient uptake and translocation by Indian Mustard. Environmental Geochemistry and health 26: 319-324.

Kurdziel, B. M., Prasad, M. N. V., Strzalka, K. 2004. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: Prasad, M. N. V. Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems. 2nd ed. Springer, printed in India. pp.146-181.

Lagriffould, A., Mocquot, B., Mench, M., Vangronsveld, J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.) Plants and soil 200: 241-250.

Liu, C. P., Shen, Z. G., Li, X. D. 2007. Accumulation and detoxification of cadmium in *Brassica pekinensis* and *B. chinensis*. Biologia Plantarum. 51 (1): 116-120.

Malkowski, E., Kurtyka, R., Kita, A., Karcz, W. 2005. Accumulation of Pb and Cd and its effect on Ca distribution in maize seedlings (*Zea mays* L.). Polish Journal of Environmental Studies 14(2): 203-207.

Markovska, Y. K., Gorinova, N. I., Nedkovska, M. P., Miteva, K. M. 2009. Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. Biologia Plantarum 53 (1): 151-154.

Martins, L.L., Mourato, M.P. 2008. Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. Revista Técnico-científica AGROS. 2: 14-18.

Martins, L.L., Mourato, M. P., Cardoso, A. I., Pinto, A. P., Mota, A. M., Gonçalves, M. L., Varennes, A. 2011. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on

growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiol Plant*.

Melo, W. J., Marques, M. O., Silva, F. C., Boaretto, A. E. 1997. Uso de resíduos sólidos urbanos na agricultura e impactos ambientais. 28p.

Milner, M. J., Kochian, L. V. 2008. Investigating heavy-metals hyperaccumulation using *Thlaspi caerulences* as a model system. *Annals of Botany*. 102: 3-13.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7 (9): 405-410.

Moller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.

Moraghan, J. T. 1993. Accumulation of cadmium and select elements in flax seed grown on a calcareous soil. *Plant & Soil*. 150: 61-68.

Noctor, G., Foyer., C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.

Pernia, B., Sousa, A., Reyes, R., Castrillo, M. 2008. Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *INCI Caracas Feb*. 33 (2): 112-119.

Prasad, M. N. V. 2004. *Heavy Metal Stress in Plants*: Springer.

Regulamento (CE) nº 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.

Scandalios, J. 2002. Oxidative stress responses – What have genome-scale studies taught us?. *Genome Biology* 3:1-6.

Siedlecka, A., Baszynski, T. 1993. Inhibition of electron flow around photo system I in chloroplast of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiol Plant*, 87: 149–202.

Simonne, E. H., Smittle, D. A., Mills, H. A. 1993. An irrigation scheduling model for turnip greens. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118 (6): 726-730.

Sims, D. A., Gamon, J.A. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Rem Sens Environ* 81:337–354.

Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinska, S., Miszański, Z. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signaling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*. 54(1): 39-50.

Smeets, K., Ruytinx, J., Van Belleghem, F., Semane, B., Lin, D., Vangronsveld, J., Cuypers, A. 2007. Critical evaluation and statistical validation of a hydroponic culture system for *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 212-218.

Smittle, D. A., Dickens, W. L., Stansell, J. R., Simonne, E. 1992. Irrigation regimes affect leaf yield and water use by turnip and mustard. *Hortscience*, 27(4): 308-310.

Soares, A. M. S. S., Machado, O. L. T. 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigénio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*. 1(1): 9-17.

Thys, C., Vanthomme, C. P., Schrevens, E., de Proft M. 1991. Interactions of Cd with Zn, Cu, Mn and Fe for lettuce in hydroponic culture. *Plant, Cell & Environ*, 14: 713–717.

Wang-da, C., Hai-gen, Y., Hong-mei, Z., Xian-guo, T. 2009. Influences of cadmium on grain mineral nutrient contents of two rice genotypes differing in grain cadmium accumulation. *Rice Science*, 16 (2): 151-156.

Wang, J., Evangelou, B. P., Nielsen, M. T. 1992. Surface chemical properties of purified root cell walls from two tobacco genotypes exhibiting different tolerance to manganese toxicity. *Plant Physiol.* 100: 496-501.

Wang Z, Zhang YX, Huang ZB, Huang L. 2008. Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant Soil* 310:137–149.